

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年9月7日 (07.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/64754 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07K 16/46, 16/28, C12N 15/13, 5/10, C12P 21/08, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/577, A61K 39/395, A61P 11/06, 17/00, 27/14, 37/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/01656

(22) 国際出願日: 2001年3月2日 (02.03.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-059508 2000年3月3日 (03.03.2000) JP  
特願2000-401563 2000年12月28日 (28.12.2000) JP

(71) 出願人: 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 設楽研也 (SHITARA, Kenya). 花井陳雄 (HANAI, Nobuo). 庄司絵美 (SHOJI, Emi). 桜田幹子 (SAKURADA, Mikiko). 古谷安希子 (FURUYA, Akiko). 中村和靖 (NAKAMURA, Kazuyasu). 丹羽倫平 (NIWA, Rinpei). 柴田健志 (SHIBATA, Kenji). 山崎基生 (YAMASAKI, Motoo); 〒194-0023 東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士 小栗昌平, 外 (OGURI, Shohei et al.); 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[続葉有]

(54) Title: GENE RECOMBINANT ANTIBODY AND ITS FRAGMENT

(54) 発明の名称: 遺伝子組換え抗体およびその抗体断片

(57) Abstract: A gene recombinant antibody or its fragment specifically reacting with the extracellular domain of human CCR4; a DNA encoding this gene recombinant antibody or its fragment; a process for producing this gene recombinant antibody or its fragment; a method of immunologically detecting CCR4, a method of immunologically detecting cells with the expression of CCR4 on the surface thereof, a method of lessening or eliminating cells with the expression of CCR4 on the surface thereof, and a method of inhibiting the production of Th2 cytokine, each by using the above gene recombinant antibody or its fragment; and drugs, remedies or diagnostics for Th2-mediated immune diseases and remedies or diagnostics for blood cancer each containing the above gene recombinant antibody or its fragment as the active ingredient.

(57) 要約:

ヒト CCR4 の細胞外領域に対して、特異的に反応する遺伝子組換え抗体またはその抗体断片；該遺伝子組換え抗体またはその抗体断片をコードする DNA、該遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の製造方法；該遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、CCR4 を免疫学的に検出する方法、CCR4 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法、CCR4 を細胞表面に発現した細胞を減少または除去する方法、Th2 サイトカインの産生を抑制する方法；および該遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする医薬、Th2 介在性免疫疾患の治療または診断剤、血液癌の治療または診断剤。

WO 01/64754 A1



(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 國際調査報告書

## 明細書

### 遺伝子組換え抗体およびその抗体断片

#### 技術分野

本発明は、ヒトの CC ケモカイン受容体 4 (以下、CCR4 と表記する) の細胞外領域に対して、特異的に反応する遺伝子組換え抗体およびその抗体断片に関する。さらに、本発明は、細胞障害活性、Th2 細胞によるサイトカイン産生抑制活性を示し、特定の相補性決定領域 (以下、CDR と表記する) を含むヒト化抗体、ヒト抗体等の CCR4 に特異的に反応する遺伝子組換え抗体およびその抗体断片に関する。さらに、本発明は、上記の抗体をコードする DNA に関する。さらに、本発明は、該 DNA を含むベクターおよび該ベクターにより形質転換された形質転換体に関する。さらに、本発明は、該形質転換体を用いた上記の抗体の製造方法、ならびに該抗体を用いるアレルギー性疾患を始めとする Th2 介在性免疫疾患の治療または診断剤等の医薬に関する。さらに、本発明は、該抗体を用いる白血病のような血液癌を始めとする癌疾患の治療または診断剤等の医薬に関する。

#### 背景技術

気管支喘息を始めとするアレルギー疾患には好酸球や肥満細胞、IgE など様々な因子が関与している。好酸球は炎症局所に浸潤し、脱顆粒により MBP (major basic protein) 等の細胞傷害性塩基性蛋白質を放出して周囲の組織傷害を誘発する。肥満細胞は B 細胞から産生された IgE と抗原との免疫複合体と結合することでヒスタミンを放出し、即時型アレルギー反応を誘発する。これらをコントロールしているのはサイトカイン・ケモカイン等の生体機能分子であり、細胞間の情報伝達を担っている。好酸球は IL-5 によって分化誘導・寿命延長を受け、さらに脱顆粒が誘発される。IgE は IL-4 によって活性化された B 細胞から産生され、抗原との免疫複合体となり肥満細胞

の脱颗粒を促す。また肥満細胞からも IL-4、IL-13 などが産生され、B 細胞からの IgE 産生に寄与することが判明しており、アレルギーの増強ループの存在が確認されている (Am. J. Respir. Crit. Care Med., 152, 2059 (1995) 、 Immunol. Today, 15, 19 (1994) )。このように炎症性細胞間には巧妙なサイトカイン・ケモカインネットワークが存在し、複雑にバランスを保っている。

これらサイトカイン・ケモカインを産生するのは、細胞表面に CD4 を発現しているヘルパーT 細胞 (以下、CD4+Th 細胞と表記する) である。実際に、気管支喘息患者の気道炎症局所にはヘルパーT 細胞の浸潤が顕著に見られること、そのうちのかなりの T 細胞は活性化していること、喘息の重症度や気道過敏性の程度と活性化 T 細胞数とが相関すること、さらに末梢血中にも活性化 T 細胞が増加していることなどが明らかにされている (Am. Rev. Respir. Dis., 145, S22 (1992) )。

ヘルパーT 細胞は、産生されるサイトカインによって Th1 細胞と Th2 細胞に分類される (Annu. Rev. Immunol., 7, 145 (1989) )。Th2 が産生するサイトカインとして、IL-4、IL-5 および IL-13 などがあげられる。

アトピー性疾患患者より分離した抗原特異的 T 細胞クローニングは、イン・ビトロ (*in vitro*) で刺激すると Th2 サイトカインを放出し (Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 88, 4538 (1991) )、喘息患者の気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid : 以下 BAL と表記する) や気道粘膜には Th2 細胞が存在することも判明している (N. Engl. J. Med., 326, 298 (1992) 、 Eur. J. Immunol., 23, 1445 (1993) )。アレルギー性炎症動物モデルでの BAL 中細胞の mRNA 発現を調べると、Th2 サイトカインである IL-4、IL-5 が上昇している (Clin. Immunol. Immunopathol., 75, 75 (1995) )。さらに、マウスに誘導した Th2 細胞を静脈内および鼻腔内に投与した場合、肺に抗原特異的な喘息様炎症症状が誘導され (J. Exp. Med., 186, 1737 (1997) 、 J. Immunol., 160, 1378 (1998) )、好酸球增多症を引き起こす (J. Immunol., 161, 3128 (1998) )。喘息患者の気道粘膜組織、アトピー性皮膚炎患者の病変部においては IL-5 の発現が認められ (J. Clin. Invest., 87, 1541 (1991) 、 J. Exp. Med., 173,

775 (1991) )、通年性鼻アレルギー患者粘膜の IL-13 の発現強度と血清総 IgE 値、抗原特異的 IgE 値とはよく相関する (治療学, 32, 19 (1998) )。

ケモカインは、白血球遊走および白血球活性化作用を有する塩基性のヘパリン結合性蛋白質の総称であり、一次構造上で保存されたシステイン残基の位置によって、CXC、CC、C、および CX<sub>3</sub>C のサブファミリーに分類される。現在までに 16 種類のケモカイン受容体が同定されており (Curr. Opin. Immunol., 11, 626 (1999) )、また、各種ケモカイン受容体の発現は、Th1 細胞、Th2 細胞などの各自白血球表面で異なることが示されている (細胞工学, 17, 1022 (1998) )。

ヒト CCR4 は、ヒト未熟好塩基球細胞株 KU-812 から K5-5 としてクローニングされた、G 蛋白質共役型の 7 回膜貫通型受容体であり、配列番号 17 で示されるアミノ酸配列を有する。CCR4 の膜貫通領域は 40~67 番目、78~97 番目、113~133 番目、151~175 番目、207~226 番目、243~270 番目、285~308 番目と推定されるので、細胞外領域は、アミノ酸配列 1~39 番目、98~112 番目、176~206 番目、271~284 番目であり、細胞内領域は 68~77 番目、134~150 番目、227~242 番目、309~360 番目であると推定される (J. Biol. Chem., 270, 19495 (1995) )。クローニング当時は CCR4 のリガンドが MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  )、RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted) 、または MCP-1 (monocyte chemotactic protein) であると報告されていた (Biochem. Biophys. Res. Commun., 218, 337 (1996) 、W096/23068)。しかし、その後刺激したヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells (以下、PBMC と表記する) ) や胸腺細胞から產生される TARC (thymus and activation - regulated chemokine) (J. Biol. Chem., 271, 21514 (1996) ) が CCR4 に特異的に結合することが判明した (J. Biol. Chem., 272, 15036 (1997) )。さらに、マクロファージから単離された MDC (macrophage-derived chemokine) (J. Exp. Med., 185, 1595 (1997) )、別名 STCP-1 (stimulated T cell chemotactic protein-1) (J. Biol. Chem., 272, 25229 (1997) ) が TARC よりも強く CCR4 に結合することも報告されている (J. Biol. Chem., 273, 1764 (1998) )。

サイトカイン・ケモカイン産生能を持つ CD4+Th 細胞に CCR4 が発現していることが示され (J. Biol. Chem., 272, 15036 (1997) )、さらに CD4+Th 細胞の中でも Th2 細胞に選択的に発現していることが報告された (J. Exp. Med., 187, 129 (1998) 、J. Immunol., 161, 5111 (1998) )。さらに、エフェクター／メモリーT 細胞 (CD4+／CD45RO+) 集団中に CCR4+細胞が確認され、CCR4+細胞を刺激すると IL-4、IL-5 を產生するが IFN- $\gamma$  は產生されない (Int. Immunol., 11, 81 (1999) )。またメモリーT 細胞中の CLA (cutaneous lymphocyte antigen) 陽性、 $\alpha 4 \beta 8$  インテグリン陰性集団に CCR4+細胞が属しており、CCR4 は腸管免疫ではなく皮膚などの全身性免疫に関わるメモリーT 細胞に発現していることが報告されている (Nature, 400, 776 (1999) )。以上のことから、炎症が誘発された場合に活性化を受けるメモリーT 細胞は CCR4 を発現し、そのリガンドである MDC や TARC によって炎症局所に遊走して他の炎症性細胞の活性化を促す可能性が強く示唆される。

現在の Th2 介在性免疫疾患に対する治療法としては、①サイトカイン・ケモカインに対する拮抗剤／ヒト化抗 IL-5 抗体 (SB-240563 : スミス・クラインビーチャム社、Sch-55700 (CDP-835) : シェーリング・プラウ／セルテック社) 、ヒト化抗 IL-4 抗体 (US Patent No. 5,914,110) 、可溶性ケモカイン受容体 (J. Immunol., 160, 624 (1998) ) など、②サイトカイン・ケモカイン産生抑制剤／IL-5 産生阻害剤 (特開平 8-53355) 、レチノイドアンタゴニスト (W099/24024) 、トシリ酸スプラタスト (IPD-1151T、大鵬薬品工業社製) など、③好酸球や肥満細胞などの最終的な炎症性細胞を対象としたもの／ヒト化抗 IL-5 受容体抗体 (W097/10354) 、CC ケモカイン受容体 3 (CCR3) 拮抗剤 (特開平 11-147872) など、④炎症性生体機能分子阻害剤／ヒト化抗 IgE 抗体 (Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157, 1429 (1998) ) など、が開発されているが、これらは複雑なサイトカイン・ケモカイン・炎症性細胞間のネットワークの一部を阻害するだけであり、根治的ではない。T 細胞を制御するものとしては抗 CD4 抗体があり、重度のステロイド依存性喘息に効果をあげている。しかし CD4 分

子は免疫担当細胞に広く発現しているため、特異性に欠け、かつ、強い免疫抑制作用を伴うという欠点を有する (Int. Arch. Aller. Immunol., 118, 133 (1999) )。

このことから、これらすべてを抑制するためには、アレルギー反応の上流部、すなわち Th2 細胞の制御が必要となる。

現在の重度の Th2 介在性免疫疾患患者に対する主な治療法はステロイド投与であるが、ステロイドによる副作用を免れることは出来ない。また、ステロイド投与を中止した場合には、患者の病態はまた元に戻り、長期間のステロイド投与は耐性を獲得するなどの欠点を有する。

これまで、CCR4 を発現している細胞を検出でき、かつ、CCR4 発現細胞に対して細胞障害性を有するモノクローナル抗体は確立されていない。さらに、Th2 サイトカインの産生を抑制する治療薬はこれまでに知られていない。

白血病においても CCR4 が発現していることが報告されているが (Blood, 96, 685 (2000) )、それら白血病細胞を障害するような治療薬はこれまでに報告されていない。一般にヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体をヒトに投与すると、異物として認識されることにより、ヒト体内にマウス抗体に対するヒト抗体 (Human Anti Mouse Antibody : 以下、HAMA と表記する) が誘導されることが知られている。HAMA は投与されたマウス抗体と反応し、副作用を引き起こしたり (J. Clin. Oncol., 2, 881 (1984) 、Blood, 65, 1349 (1985) 、J. Natl. Cancer Inst., 80, 932 (1988) 、Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 82, 1242 (1985) )、投与されたマウス抗体の体内からの消失を速め (J. Nucl. Med., 26, 1011 (1985) 、Blood, 65, 1349 (1985) 、J. Natl. Cancer Inst., 80, 937 (1988) )、マウス抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている (J. Immunol., 135, 1530 (1985) 、Cancer Res., 46, 6489 (1986) )。

これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用してヒト以外の動物の抗体をヒト型キメラ抗体あるいはヒト型相補性決定領域 (Complementarity Determining Region : 以下、CDR と表記する) 移植抗体などのヒト化抗体にすることが試みられて

いる。ヒト型キメラ抗体とは、抗体可変領域（以下、V領域と表記する）がヒト以外の動物の抗体で、定常領域（以下、C領域と表記する）がヒト抗体である抗体であり（Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81, 6851 (1984)）、ヒト型 CDR 移植抗体とは、ヒト以外の動物の抗体のV領域中の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の適切な位置に移植した抗体である（Nature, 321, 522 (1986)）。これらのヒト化抗体は、マウス抗体等のヒト以外の動物の抗体に比較してヒトへの臨床応用上、様々な利点を有している。例えば、免疫原性および血中での安定性に関しては、ヒト型キメラ抗体では、ヒトに投与した場合、マウス抗体に比べて血中半減期が約 6 倍伸びたことが報告されている（Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86, 4220 (1989)）。ヒト型 CDR 移植抗体では、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が 4~5 倍伸びたことが報告されている（J. Immunol., 147, 1352 (1991)）。即ち、ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、副作用が少なく、その治療効果が長期間持続することが期待される。また、特に CCR4 発現細胞数を減少させる治療においては、抗体の Fc 領域（抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域）を介した補体依存性細胞障害活性（以下、CDC 活性と表記する）や抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC 活性と表記する）等の細胞障害活性の高さがその治療効果に重要であるが、こうした細胞障害活性に関しても、ヒトにおいてはヒト以外の動物の抗体の Fc 領域よりも、ヒト抗体の Fc 領域の方がヒト補体成分や、単核球、マクロファージ、NK 細胞等の様な Fc 受容体を細胞表面に有するヒトエフェクター細胞をより効率的に活性化できる為、より優れていることが報告されている。例えば、GD2 に対するマウス抗体の Fc 領域をヒト抗体の Fc 領域に変換したヒト型キメラ抗体は、ヒトエフェクター細胞による腫瘍細胞障害活性が上昇することが報告されており（J. Immunol., 144, 1382 (1990)）、また、CAMPATH-1 抗原に対するヒト型 CDR 移植抗体についても同様の結果が報告されている（Nature, 332, 323 (1988)）。

以上の結果は、ヒトへの臨床応用に用いる抗体としては、ヒト化抗体の方がマウス抗体等のヒト以外の動物の抗体より望ましいことを明確に示している。

更に、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体（以下、scFv と表記する）（*Science*, 242, 423 (1988)）、ジスルフィド安定化V領域断片（以下、dsFv と表記する）（*Molecular Immunol.*, 32, 249 (1995)）等の、より分子量の小さい抗体の断片の作製が可能となっている。これらの断片は、完全な抗体分子に比べ分子量が小さい為、標的組織への移行性に優れている（*Cancer Res.*, 52, 3402 (1992)）。これらの断片についても、ヒトへの臨床応用の場合には、マウス抗体等のヒト以外の動物の抗体よりもヒト化抗体に由来する方が、より望ましいと考えられる。

これまで述べてきたように、ヒト化抗体およびその断片は、単独の使用によっても診断および治療の効果が期待されるが、更に他の分子との併用により、その効果をより高めることが検討されている。例えば、それら分子の一つとしてサイトカインが用いられている。サイトカインは免疫反応における細胞間相互作用を司る種々の液性因子の総称である。抗体の細胞障害活性には、CDC活性やADCC活性等が知られているが、ADCC活性は、単核球、マクロファージ、NK細胞の様なFc受容体を細胞表面に有するエフェクター細胞によって担われている（*J. Immunol.*, 138, 1992 (1987)）。種々のサイトカインはこれらのエフェクター細胞を活性化することから、抗体のADCC活性等を高める目的で、抗体と組み合わせて投与することが行われている。

## 発明の開示

抗体は重鎖（以下、H鎖と表記する）および軽鎖（以下、L鎖と表記する）のV領域のCDRを介して抗原に結合し、CDRのアミノ酸配列が抗体の結合反応性、結合特異性を規定している（*J. Exp. Med.*, 132, 211 (1970)）。従って、特にCDRが新規なアミノ酸配列を有し、公知の抗CCR4抗体とは異なる結合反応性、細胞障害活性等を有するヒトCCR4に特異的に結合する抗CCR4抗体が求められている。また、サイトカイン産生細胞であるCCR4発現Th2細胞を選択的に除去できる抗体、Th2サイトカインの産生を抑制する抗体、該抗体を用いる診断薬および治療薬が求められている。さらに、造

血系細胞が腫瘍化した疾患である白血病等の血液癌を診断および治療するための有用な方法が求められている。

本発明者らは、IgG1 クラスに属する CCR4 に対するマウスモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ KM2160 より抗体 H鎖 cDNA および L鎖 cDNA を取得し、それらの V 領域の CDR が新規なアミノ酸配列を有することを見出し、該新規 CDR を有する H鎖 V 領域および L鎖 V 領域をコードする cDNA を、ヒト抗体 H鎖 C 領域およびヒト抗体 L鎖 C 領域をコードする cDNA を有する動物細胞用発現ベクターにクローニングしてヒト化抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することにより抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 を発現、精製した。該抗体がヒト CCR4 に特異的に反応し、かつ抗原陽性細胞株に対して強い細胞障害活性を示すことでその細胞数の減少を証明し、該抗体のヒト生体内での使用における有用性を示し、本発明を完成させた。

さらに、本発明者らは、CCR4 に対する遺伝子組換え抗体が白血病細胞、特に T 細胞系白血病細胞に高率に反応し、かつ CCR4 陽性白血病細胞に対する強い細胞障害活性を示すことでその細胞数の減少を証明し、該抗体のヒト白血病等の血液癌の診断、治療における有用性を示し、本発明を完成させた。

本発明は、以下の (1) ~ (47) に関する。

- (1) ヒト CCR4 の細胞外領域に対して、特異的に反応する遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。
- (2) 細胞外領域が、配列番号 17 で示されるアミノ酸配列の 1~39、98~112、176~206 および 271~284 番目からなる群から選ばれる細胞外領域である上記 (1) 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。
- (3) 配列番号 17 で示されるアミノ酸配列の 2~29 番目に存在するエピトープを認識する上記 (1) または (2) に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。
- (4) CCR4 発現細胞に特異的に反応する上記 (1) ~ (3) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(5) CCR4 発現細胞に対し細胞障害活性を示す上記 (1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

細胞障害活性としては、CDC 活性、ADCC 活性などがあげられる。

(6) CCR4 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞障害活性を示す上記 (5) 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞障害活性とは、後述する遺伝子組換え抗体を作製する際に用いた CCR4 に特異的に反応するヒト以外の動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも得られた遺伝子組換え抗体が有する細胞障害活性のほうが高いことを意味する。

(7) 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性である上記 (5) 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(8) 抗体依存性細胞障害活性が Th2 細胞のアポトーシスを誘導することによるものである、上記 (7) 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(9) Th2 細胞を除去する作用を示す抗体である上記 (1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(10) Th2 サイトカイン産生抑制活性を示す上記 (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(11) Th2 サイトカインが、IL-4、IL-5、または IL-13 である上記 (10) 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(12) 遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体またはヒト抗体から選ばれる上記 (1) ~ (11) のいずれかに記載の遺伝子組換え抗体。

(13) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型 CDR 移植抗体である上記 (12) 記載の遺伝子組換え抗体。

(14) ヒト抗体 IgG 型に属する上記 (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体。

(15) ヒト化抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L鎖) V領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む上記 (12) 記載の遺伝子組換え抗体。

(16) ヒト型キメラ抗体が、CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) と抗体軽鎖 (L鎖) V領域と、ヒト抗体の H鎖定常領域 (C領域) と L鎖 C領域からなる上記 (13) 記載の遺伝子組換え抗体。

(17) ヒト型キメラ抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H鎖 V領域の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L鎖 V領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む上記 (16) 記載の遺伝子組換え抗体。

(18) ヒト型キメラ抗体が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 20~138 番目からなる H鎖 V領域、および配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 20~132 番目からなる L鎖 V領域を含む上記 (16) 記載の遺伝子組換え抗体。

(19) ヒト型キメラ抗体が、形質転換体 KM2760 (FERM BP-7054) が生産する、抗体 H鎖 C領域がヒト IgG1 サブクラスである、抗体 KM2760 である上記 (13) 記載の遺伝子組換え抗体。

(20) ヒト型 CDR 移植抗体が、CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) と抗体軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) と、ヒト抗体の H鎖および L鎖の C領域および V領域フレームワーク領域からなる上記 (13) 記載の遺伝子組換え抗体。

(21) ヒト型 CDR 移植抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H鎖 V領域の CDR1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L鎖 V領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む上記 (20) 記載の遺伝子組換え抗体。

(22) 上記 (1) ~ (21) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片をコードする DNA。

(23) 上記 (22) 記載の DNA とタンデム型ヒト化抗体発現用ベクターを含む組換えベクター。

(24) 上記 (23) 記載の組換えベクターが宿主細胞に導入された形質転換体。

(25) 形質転換体が KM2760 (FERM BP-7054) である上記 (24) 記載の形質転換体。

(26) 上記 (24) または (25) 記載の形質転換体を培養して培養液中に遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を生成・蓄積させ、該培養液から該抗体またはその抗体断片を回収する、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の製造方法。

(27) ヒト抗体が、抗体の抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) と抗体軽鎖 (L鎖) V領域を含む上記 (12) 記載の遺伝子組換え抗体。

(28) ヒト抗体の H鎖 V領域および L鎖 V領域の相補性決定領域 (CDR) が、それぞれ CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H鎖 V領域および L鎖 V領域の CDR のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む上記 (27) 記載の遺伝子組換え抗体。

(29) ヒト抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H鎖 V領域の CDR1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L鎖 V領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む上記 (28) 記載の遺伝子組換え抗体。

(30) ヒト抗体の H鎖 V領域および L鎖 V領域が、それぞれ CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H鎖 V領域および L鎖 V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む上記 (27) 記載の遺伝子組換え抗体。

(31) ヒト抗体が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 20~138 番目からなる H鎖 V領域、または配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 20~132 番目からなる L鎖 V領域を含む上記 (30) 記載の遺伝子組換え抗体。

(32) ヒト抗体が、ヒト抗体ファージライブラリーまたはヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体である上記 (27) ~ (31) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体。

(33) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化 V 領域断片、または抗体の相補性決定領域 (CDR) を含むペプチドである上記 (1) ~ (11) のいずれか 1 項に記載の抗体断片。

(34) 抗体断片が、抗体の抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) と抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域を含む上記 (33) 記載の抗体断片。

(35) 抗体断片の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域 (CDR) が、それぞれ CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む上記 (34) 記載の抗体断片。

(36) 抗体断片が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H 鎖 V 領域の CDR1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L 鎖 V 領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む上記 (35) 記載の抗体断片。

(37) 抗体断片の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域が、それぞれ CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む上記 (34) 記載の抗体断片。

(38) 抗体断片が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 20~138 番目からなる H 鎖 V 領域、および配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 20~132 番目からなる L 鎖 V 領域を含む上記 (37) 記載の抗体断片。

(39) 上記 (1) ~ (21) 、 (27) ~ (38) のいずれか 1 項に記載された遺伝子組換え抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合している遺伝子組換え抗体または抗体断片。

(40) 上記 (1) ~ (21) 、 (27) ~ (39) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、CCR4 を免疫学的に検出する方法。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片と検体を接触させることにより、検体中のCCR4を免疫学的に検出することができる。

(41) 上記(1)～(21)、(27)～(39)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、CCR4を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片と細胞を接触させることにより、CCR4を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出することができる。

(42) 上記(1)～(21)、(27)～(39)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、CCR4を細胞表面に発現した細胞を減少または除去する方法。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の有効量をヒトまたは動物に投与することにより、CCR4を細胞表面に発現した細胞を減少または除去することができる。

(43) 上記(1)～(21)、(27)～(39)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、Th2サイトカインの産生を抑制する方法。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の有効量をヒトまたは動物に投与することにより、Th2サイトカインの産生を抑制することができる。

(44) 上記(1)～(21)、(27)～(39)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする医薬。

(45) 上記(1)～(21)、(27)～(39)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とするTh2介在性免疫疾患の治療または診断剤。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の有効量をヒトまたは動物に投与することにより、Th2介在性免疫疾患を治療することができ、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片と検体を接触させることにより、Th2介在性免疫疾患を診断することができる。

(46) 上記(1)～(21)、(27)～(39)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする血液癌の治療または診断剤。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の有効量をヒトまたは動物に投与することにより、血液癌を治療することができ、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片と検体を接触させることにより、血液癌を診断することができる。

(47) 血液癌が白血病である上記 (46) 記載の治療または診断剤。

本発明の Th2 介在性免疫疾患としては、急性あるいは慢性の気道過敏性または気管支喘息、アトピー性皮膚炎を含むアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症などを包含する。

本発明の癌疾患としては、血液癌、特に白血病があげられる。

本発明における遺伝子組換え抗体およびその抗体断片（以下、本発明の抗体と表記する）は、ヒト CCR4 の細胞外領域に特異的に反応すればいいなるものでもよい。好ましくは、配列番号 17 で示されるアミノ酸配列の 1～39、98～112、176～206 または 271～284 番目を含む領域に特異的に反応する抗体があげられる。さらに好ましくは、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H 鎖 V 領域の CDR1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L 鎖 V 領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む抗体、ならびに配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 20～138 番目からなる H 鎖 V 領域、および配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 20～132 番目からなる L 鎖 V 領域を含む抗体があげられる。これらのアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、且つ CCR4 と特異的に反応する抗体または抗体断片も本発明の範囲に包含される。

本発明のアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意かつ 1 もしくは複数のアミノ酸配列中の位置において、1 または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてもよく、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェ

ニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

具体的な本発明の抗体としては、以下に述べるヒト化抗体、ヒト抗体およびそれらの抗体断片などがあげられる。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体H鎖V領域（以下、VHとも表記する）および抗体L鎖V領域（以下、VLとも表記する）とヒト抗体のH鎖C領域（以下、CHとも表記する）およびヒト抗体のL鎖C領域（以下、CLとも表記する）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

本発明のヒト型キメラ抗体は、CCR4に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入

してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIg と表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$  クラスあるいは $\lambda$  クラスのものを用いることができる。

抗 CCR4 キメラ抗体の具体例としては、抗体の VH が配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 20～138 番目のアミノ酸配列、CH が hIgG1 サブクラスのアミノ酸配列を有し、抗体の VL が配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 20～132 番目のアミノ酸配列、CL がヒト抗体 $\kappa$  クラスのアミノ酸配列を有する抗体 KM2760 があげられる。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の VH および VL の適切な位置に移植した抗体を意味する。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体は、CCR4 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR 配列を任意のヒト抗体の VH および VL の CDR 配列に移植した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH およびヒト抗体の CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することによりヒト型 CDR 移植抗体を発現させ、製造することができる。

ヒト型 CDR 移植抗体の CH としては、hIg に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 CDR 移植抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$  クラスあるいは $\lambda$  クラスのものを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EB ウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、scFv 等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2 本の完全な H 鎮および 2 本の完全な L 鎮からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、マウス ES 細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該 ES 細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv、および CDR を含むペプチドなどがあげられる。

Fab は、IgG を蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち (H 鎮の 224 番目のアミノ酸残基で切断される)、H 鎮の N 末端側約半分と L 鎮全体がジスルフィド結合で結合した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Fab は、CCR4 に特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体の Fab をコードする DNA を原核生物用発現ベク

ターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

$F(ab')_2$ は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の $F(ab')_2$ は、CCR4に特異的に反応する抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

Fab'は、上記 $F(ab')_2$ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFab'は、CCR4に特異的に反応する $F(ab')_2$ を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することによりFab'を発現させ、製造することができる。

scFvは、一本のVHと一本のVLとを適當なペプチドリンク（以下、Pと表記する）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明のscFvに含まれるVHおよびVLは、本発明のCCR4に特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

本発明のscFvは、CCR4に特異的に反応する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFvを製造することができる。

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法（Protein

Engineering, 7, 697 (1994) ) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明の dsFv に含まれる VH および VL は本発明の CCR4 に特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

本発明の dsFv は、CCR4 に特異的に反応する抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、dsFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFv を製造することができる。

CDR を含むペプチドは、H鎖またはL鎖 CDR の少なくとも 1 領域以上を含んで構成される。複数の CDR は、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明の CDR を含むペプチドは、CCR4 に特異的に反応する抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得した後、CDR をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDR を含むペプチドを製造することができる。

また、CDR を含むペプチドは、Fmoc 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc 法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によって製造することもできる。

本発明の抗体は、本発明の CCR4 に特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体またはそれらの抗体断片に放射性同位元素、蛋白質または薬剤などを化学的にあるいは遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

本発明の抗体の誘導体は、CCR4 に特異的に反応する抗体または抗体断片の H鎖あるいは L 鎖の N 末端側あるいは C 末端側、抗体または抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体または抗体断片中の糖鎖に放射性同位元素、蛋白質あるいは薬剤などを化学的手法（抗体工学入門、金光修著、（株）地人書館（1994））により結合させることにより製造することができる。

または、CCR4 に特異的に反応する抗体または抗体断片をコードする DNA と、結合させたい蛋白質をコードする DNA を連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入する。以上のような遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

放射性同位元素としては、<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I 等があげられ、例えば、クロラミン T 法等により、抗体に結合させることができる。

薬剤としては、低分子のものが好ましく、ナイトロジェン・マスター、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン C、ダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンプラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤等の抗癌剤（臨床腫瘍学、日本臨床腫瘍研究会編、癌と化学療法社（1996））、またはハイドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤（炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社（1982））などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタールアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、ヒトインターロイキン 2（以下、hIL-2 と表記する）、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（以下、hGM-CSF と表記する）、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（以下、hM-CSF と表記する）、ヒトインターロイキン 12（以下、hIL-12 と表記する）等があげられる。また、癌細胞を直接障害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体については、抗体または

抗体断片をコードする cDNA に蛋白質をコードする cDNA を連結させ、融合抗体をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

以下に、CCR4 に特異的に反応し、かつ H 鎮および L 鎮の V 領域に新規のアミノ酸配列を有するヒト型キメラ抗体の作製方法を例に挙げて説明する。

## 1. ハイブリドーマ產生抗 CCR4 モノクローナル抗体の作製

### (1) 抗原の調製

CCR4 をコードする cDNA を含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入してリコンビナント CCR4 蛋白質を得る。あるいは CCR4 を発現した培養腫瘍細胞もしくは該細胞より精製して得た CCR4 蛋白質、あるいは、CCR4 部分配列を有する合成ペプチドを抗原に用いることもできる。

抗原用部分ペプチドとしては、5~30 残基程度の蛋白質部分配列が選択される。変性していない天然の構造を有している状態の該蛋白質を認識する抗体を取得するためには、立体構造上蛋白質の表面に存在している部分配列を抗原ペプチドとして選択する必要がある。立体構造上蛋白質表面に存在する部分は、Genetyx Mac など市販の蛋白質配列解析ソフトを用い、親水性の高い部分配列を予測することで推測することができる。即ち、一般的に親水性の低い部分は立体構造上蛋白質の内部に存在する場合が多く、親水性の高い部分は蛋白質表面に存在する場合が多いためである。また、蛋白質の N 末端、C 末端は蛋白質表面に存在する場合が多い。しかしながら、このように選択した部分ペプチドが目的通りの抗体を確立する抗原となるとは限らない。

部分ペプチドには蛋白質と架橋するために、システインを末端に付加する。蛋白質の内部配列を選択した場合には、必要に応じペプチドの N 末端はアセチル化、C 末端はアミド化する。

部分ペプチドは一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1, Erhard Gross および Johannes Meinhofer 編、Academic Press (1979) 、第 2 卷 (1980) 、第 3 卷 (1981) ； ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善 (1985) ； 続医薬品の開発、第 14 卷、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店 (1991) ； International Journal of Peptide Protein Research, 35, 161 (1990) )。

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、Applied Biosystems, Inc., USA 社製 (以下、ABI 社と表記する) ペプチド合成機、Advanced ChemTech Inc., USA 社製 (以下、ACT 社と表記する) ペプチド合成機等の市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護した  $N\alpha$ -Fmoc-アミノ酸あるいは  $N\alpha$ -Boc-アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。

原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI 社、島津製作所、国産化学 (株) 、ノバ・バイオケム社 (Nova Biochem) 、渡辺化学 (株) 、ACT 社、またはペプチド研究所 (株) 等から入手することができる。また、原料となる保護アミノ酸、保護有機酸、保護有機アミンは報告されている合成法に従って、あるいはそれに準じて合成することができる (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1, Erhard Gross および Johannes Meinhofer 編、Academic Press (1979) 、第 2 卷 (1980) 、第 3 卷 (1981) ； ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善 (1985) ； 続医薬品の開発、第 14 卷、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店 (1991) ； International Journal of Peptide Protein Research, 35, 161 (1990) )。

## (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

免疫に用いる動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものでもよい。下記に、マウスおよびラットを用いる例を説明する。

3~20 週令のマウスまたはラットに、上記 1 (1) で調製した抗原を免疫し、その動物の脾、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバントとともに抗原を数回投与することにより行う。アジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント (Complete Freund's Adjuvant) または、水酸化アルミニウムグルと百日咳菌ワクチンなどがあげられる。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA (ウシ血清アルブミン) や KLH (Keyhole Limpet hemocyanin) などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。各投与後 3~7 日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、抗原として用いた CCR4 に対しての反応性について、酵素免疫測定法などで確認し (酵素免疫測定法 (ELISA 法)、医学書院刊 (1976) )、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給源とする。抗原物質の最終投与後 3~7 日目に、免疫したマウスまたはラットより公知の方法 (Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988) ) に準じて脾臓を摘出し、脾細胞と骨髓腫細胞とを融合させる。

## (3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c 由来) 骨髓腫細胞株 P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) (Euro. J. Immunol., 6, 511 (1976) )、SP2/0-Ag14 (SP-2) (Nature, 276, 269 (1978) )、P3-X63-Ag8653 (653) (J. Immunol., 123, 1548 (1979) )、P3-X63-Ag8 (X63) (Nature, 256, 495 (1975) ) など、*in vitro* で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法 (Antibodies-A Laboratory

Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988) ) に従い、細胞融合時までに  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

#### (4) 細胞融合

上記で得られた抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄には MEM 培地または PBS (リン酸二ナトリウム 1.83 g、リン酸一カリウム 0.21 g、食塩 7.65 g、蒸留水 1 リットル、pH 7.2) などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT 培地 {正常培地 (RPMI-1640 培地にグルタミン (1.5 mM)、2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-5}$  M)、ジエンタマイシン (10  $\mu$ g/ml) および牛胎児血清 (FCS) (CSL 社製、10%) を加えた培地) にヒポキサンチン (10 $^{-4}$  M)、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5}$  M) およびアミノブテリン ( $4 \times 10^{-7}$  M) を加えた培地} を用いる。

培養後、培養上清の一部をとり、酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

#### (5) ハイブリドーマ産生抗 CCR4 モノクローナル抗体の選択

抗 CCR4 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988) に述べられている方法などに従い、以下に述べる測定法により行う。これらの方法により、後述する抗 CCR4 ヒト型キメラ抗体、該抗体断片を産生する形質転換株の培養上清中に含まれる抗 CCR4 抗体あるいはすべての精製抗 CCR4 抗体の結合活性を測定することができる。

**酵素免疫測定法：**

抗原を 96 穴 ELISA プレートに固層化する。ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体のイムノグロブリンを認識できる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗体である。具体的にはハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行ない、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

当該ハイブリドーマ株の具体例としては、ハイブリドーマ株 KM2160 があげられる。

**(6) モノクローナル抗体の精製**

プリスタン処理 (2, 6, 10, 14-テトラメチルペントデカン (Pristane) 0.5 ml を腹腔内投与し、2 週間飼育する) した 8~10 週令のマウスまたはヌードマウスに、上記 1 (4) で得られる抗 CCR4 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞  $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$  細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21 日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該マウスまたはヌードマウスから腹水を採取し、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテイン A-カラムあるいはセルロファイン GSL2000 (生化学工業社製) のカラムなどを用いて、IgG あるいは IgM 画分を回収し、精製モノクローナル抗体とする。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイプキットまたはラットモノクローナル抗体タイプキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは 280 nm での吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 があげられる。

マウス IgG2a、IgG2b、IgG3 およびヒト IgG1、IgG3 タイプは、比較的強い CDC 活性および ADCC 活性等の細胞障害活性を有し、治療への応用上、有用である。

## 2. ヒト化抗体の作製

### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の H 鎖 C 領域および L 鎖 C 領域をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の H 鎖 C 領域および L 鎖 C 領域をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の C 領域は任意のヒト抗体の H 鎖 C 領域および L 鎖 C 領域であることができ、例えば、ヒト抗体の H 鎖の IgG1 サブクラスの C 領域（以下、hC $\gamma$ 1 と表記する）およびヒト抗体の L 鎖の  $\kappa$  クラスの C 領域（以下、hC $\kappa$  と表記する）等があげられる。ヒト抗体の H 鎖 C 領域および L 鎖 C 領域をコードする遺伝子としてはエキソンとインtron からなる染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 (Cytotechnology, 3, 133 (1990) )、pAGE103 (J. Biochem., 101, 1307 (1987) )、pHSG274 (Gene, 27, 223 (1984) )、pKCR (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 78, 1527 (1981) )、pSG1  $\beta$  d2-4 (Cytotechnology, 4, 173 (1990) ) 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー (J. Biochem., 101, 1307 (1987) )、モロニーマウス白血病ウイルスの LTR プロモーターとエンハンサー (Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987) )、免疫グロブリン H 鎖のプロモーター (Cell, 41, 479 (1985) ) とエンハンサー (Cell, 33, 717 (1983) ) 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖および L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプ或いは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖および L 鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい（J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)）。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 (W097/10354)、pEE18 (HYBRIDOMA, 17, 559 (1998) ) 等があげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

## (2) ヒト以外の動物由来の抗体の V 領域をコードする cDNA の取得およびアミノ酸配列の解析

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の H 鎖の V 領域および L 鎖の V 領域をコードする cDNA は以下の様にして取得する。

マウス抗体などを産生するハイブリドーマ細胞より mRNA を抽出し、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングして cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体の C 領域部分或いは V 領域部分をプローブとして用い、H 鎖 V 領域をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミドおよび L 鎖 V 領域をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の全塩基配列を決定し、塩基配列より H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジンートリフルオロ酢酸セシウム法 (Methods in Enzymol., 154, 3 (1987) )、また全

RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989) ) 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞から mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。

cDNA の合成および cDNA ライブラリー作製法としては、常法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989) ; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34)、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法等があげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express (Strategies, 5, 58 (1992) )、pBluescript II SK (+) (Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989) )、 $\lambda$  zap II (Stratagene 社製)、 $\lambda$  gt10、 $\lambda$  gt11 (DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985) )、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、 $\lambda$  ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia 社製)、pcD2 (Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983) ) および pUC18 (Gene, 33, 103 (1985) ) 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' (Strategies, 5, 81 (1992) )、C600 (Genetics, 39, 440 (1954) )、Y1088、Y1090 (Science, 222, 778 (1983) )、NM522 (J. Mol. Biol., 166, 1 (1983) )、K802 (J. Mol. Biol., 16, 118 (1966) ) および JM105 (Gene, 38, 275 (1985) ) 等が用いられる。

cDNA ライブラリーからのヒト以外の動物の抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする cDNA クローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブラーク・ハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989) ) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction (以下、PCR 法と表記する ; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989) ; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34) により H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする cDNA を調製することもできる。

上記方法により選択された cDNA を、適当な制限酵素等で切断後、pBluescript SK (–) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger, F.) らのジデオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 74, 5463 (1977) ) 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNA シークエンサー (Pharmacia 社製) 等を用いて解析することで該 cDNA の塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991) ) と比較することにより、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。分泌シグナル配列を含む抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991) ) と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよび N 末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、H 鎖 V

領域および L 鎖 V 領域の各 CDR のアミノ酸配列についても、既知の抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991) ) と比較することによって見出すことができる。

更に H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の完全なアミノ酸配列を用いて任意のデータベース、例えば、SWISS-PROT や PIR-Protein 等に対して BLAST 法 (J. Mol. Biol., 215, 403 (1990) ) 等の配列の相同性検索を行い、配列の新規性を検討することができる。

#### (3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖 C 領域および L 鎖 C 領域をコードする遺伝子の上流に、ヒト以外の動物の抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする cDNA を、ヒト以外の動物の抗体 H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の 3' 末端側の塩基配列とヒト抗体の H 鎖 C 領域および L 鎖 C 領域の 5' 末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成 DNA とそれぞれ連結し、それぞれを上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖 C 領域および L 鎖 C 領域をコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。また、ヒト以外の動物の抗体 H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の cDNA を、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成 DNA を用いて PCR 法により増幅し、それぞれを上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

#### (4) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする cDNA は、以下の様にして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の H 鎖 V 領域およ

び L 鎖 V 領域の CDR のアミノ酸配列を移植するヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank 等のデータベースに登録されているヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列、ヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991) ) 等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列とでできるだけ高い相同性 (少なくとも 60%以上) を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。次に、選択したヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR のアミノ酸配列を移植し、ヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991) ) を考慮して DNA 配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を設計する。設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率および合成可能な DNA の長さから、H 鎖、L 鎖とも 6 本の合成 DNA を設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、上記 2 (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR 反応後、增幅産物を pBluescript SK (-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、上記 2 (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を有するプラスミドを取得する。

### (5) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR のみをヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の FR に移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991) )。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域では、CDR のみならず、FR のいくつかのアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基が CDR の移植に伴い、ヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の FR の異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型 CDR 移植抗体では、ヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基や CDR のアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991) )。ヒト型 CDR 移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わる FR のアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのために X 線結晶解析 (J. Mol. Biol., 112, 535 (1977) ) 或いはコンピューターモデリング (Protein Engineering, 7, 1501 (1994) ) 等による抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型 CDR 移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型 CDR 移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の FR のアミノ酸残基の改変は、改変用合成 DNA を用いて上記 2 (4) に記載の PCR 法を行うことにより、達成できる。PCR 後の増

幅産物について上記 2 (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

#### (6) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖 C 領域および L 鎖 C 領域をコードする遺伝子の上流に、上記 2 (4) および (5) で構築したヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

例えば、上記 2 (4) および (5) でヒト型 CDR 移植抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖 C 領域および L 鎖 C 領域をコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングすることができる。

#### (7) ヒト化抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、上記 2 (3) および (6) に記載のヒト化抗体発現ベクター、或いはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト化抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、COS-7 細胞 (ATCC CRL1651) が一般に用いられる (Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991) )。COS-7 細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法 (Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991) )、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 84, 7413 (1987) ) 等があげられる。

発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法 ( (ELISA 法) ; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988) 、 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996) ) 等により測定できる。

#### (8) ヒト化抗体の安定発現

上記 2 (3) および (6) に記載のヒト化抗体発現ベクターを適當な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法（特開平2-257891、Cytotechnology, 3, 133 (1990) ) 等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウス SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC CRL1581) 、マウス P3X63-Ag8.653 細胞 (ATCC CRL1580) 、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（以下、dhfr と表記する）が欠損した CHO 細胞 (Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 77, 4216 (1980) ) 、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL1662、以下、YB2/0 細胞と表記する) 等があげられる。

抗体依存性細胞障害活性を有する抗体を製造するための宿主細胞としては、抗体の Fc 領域に結合する N-アセチルグルコサミンにフコースを付加させる反応に関連する酵素活性の低いまたは当該酵素活性を有しない細胞を用いることが好ましい。具体的には、YB2/0 細胞があげられる。

N-アセチルグルコサミンにフコースを付加させる酵素としては、 $\alpha$ 1,6 結合に関与する酵素、具体的には  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、GDP-フコースの生合成に関係する酵素、具体的には GDP-マンノース 4,6-デハイドロターゼ、GDP- $\beta$ -L-フコスピロフォスフォリラーゼ、フコキナーゼなどがあげられる。したがって、宿主細胞として用いる細胞の、これらの酵素の遺伝子を欠損させたり、該遺伝子への変異を与えて酵素活性を低下させるかあるいは欠失させたりなどの人為的変異を行うことにより得られた細胞を、宿主細胞として用いることもできる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、本発明の遺伝子組換え抗体を生産させることができればいかなる細胞でもよいが、動物細胞が好ましい。動物細胞としては、YB2/0 細胞、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、Sp2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44 細胞、サルの細胞である COS 細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞などがあげられる。

当該宿主細胞を用いることにより、抗体の Fc 領域に結合する糖鎖が、N-アセチルグルコサミンにフコースが結合しない N-グルコシド結合糖鎖含量が高い抗体を取得することができる。当該抗体は、CCR4 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い抗体依存性細胞障害活性を示す。

発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に発現する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 sulfate (以下、G418 と表記する: Sigma 社製) 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (日本製薬社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302 培地 (JRH 社製)、IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製)、Hybridoma-SFM 培地 (GIBCO BRL 社製)、またはこれら培地に FCS 等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は ELISA 法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、dhfr 増幅系等を利用してヒト化抗体の発現量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996) )。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濃過、イオン交換クロマトグラフィーおよび

限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎮、L 鎮或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、SDS-PAGE と表記する：Nature, 227, 680 (1970) ）やウエスタンプロッティング法 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988) 、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996) ) 等で測定することができる。

#### (9) ヒト化抗体の活性評価

精製したヒト化抗体の抗原との結合活性、CCR4 発現細胞株に対する結合活性は ELISA 法および蛍光抗体法 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993) ) 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定し、評価することができる (Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993) )。

### 3. 抗 CCR4 抗体を用いた CCR4 の検出および定量法

本発明は、本発明の抗体を用いて、CCR4 または CCR4 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出および定量する方法に関する。

本発明の抗体を用いて、CCR4、CCR4 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法 (ELISA 法) 、放射性物質標識免疫抗体法 (RIA) 、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法 (ABC 法、CSA 法等) 、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチ ELISA 法 (单クローニング抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987) 、続生化学実験講座 5 免疫生化学研究法、東京化学同人 (1986) ) などがあげられる。

蛍光抗体法とは、分離した細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質でラベルした抗イム

ノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

免疫酵素抗体法 (ELISA 法) とは、分離した、細胞あるいはその破碎液、組織あるいはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法 (RIA) とは、分離した、細胞あるいはその破碎液、組織あるいはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、分離した、細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

サンドイッチ ELISA 法とは、本発明の抗体で、抗原認識部位の異なる 2 種類の抗体のうち、あらかじめ一方の抗体はプレートに吸着させ、もう一方の抗体は FITC などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素で標識しておき、抗体吸着プレートに、分離した、細胞あるいはその破碎液、組織あるいはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などを反応させた後、標識した抗体を反応させ、標識物質に応じた反応を行う方法である。

#### 4. Th2 介在性免疫疾患または癌疾患の診断及び治療

本発明のヒト化抗体は、培養細胞株に発現している CCR4 と特異的に結合し、かつ CDC 活性および ADCC 活性等の細胞障害活性を示すため、Th2 介在性疾患等の診断、治療において有用であると考えられる。また、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒト抗体

のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において強い細胞障害活性を示し、かつ免疫原性を示さず、その効果が長期間に渡り持続することが期待される。

また、本発明の抗体を、被験者の細胞あるいは組織に投与することにより、細胞が产生する Th2 サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 等の产生を抑制することができる。

本発明に係る Th2 細胞としては、好ましくは、活性化 Th2 細胞またはメモリー Th2 細胞などがあげられる。具体的には、CD45RA- および CD4+ の性質を有する細胞があげられる。

本発明の遺伝子組換え抗体が有する細胞障害活性は、Th2 細胞に本発明の抗体が結合し、当該細胞にアポトーシスを誘導することなどにより生ずる。また、アポトーシスを誘導することにより当該細胞に障害を与え、除去することができる。

また、Th2 介在性免疫疾患または癌疾患の診断方法としては、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒト CCR4 陽性細胞を、上述した免疫学的に検出する方法があげられる。

また、本発明の抗体は、Th2 介在性免疫疾患または癌疾患、また異常な Th2 細胞の増加・減少により病態が進行する疾患の診断薬として用いることができる。

さらに、本発明の抗体はその細胞障害活性によりヒト CCR4 発現細胞を減少もしくは除去できるため、本発明の抗体を用いる Th2 介在性免疫疾患または癌疾患の診断方法あるいは治療方法、本発明の抗体を有効成分とする、Th2 介在性免疫疾患または癌疾患の治療薬および予防薬が提供される。

Th2 介在性免疫疾患とは、軽度・重度に関わらず、急性あるいは慢性の気道過敏性や気管支喘息、アトピー性皮膚炎を含むアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症などの炎症性疾患、Th2 細胞から放出されるサイトカイン・ケモカインによって増殖もしくは活性化し得る好酸球や肥満細胞などの炎症担当細胞、ならびに Th2

細胞から放出されるサイトカイン・ケモカインによって産生される IgE 等の生体機能分子に基づく疾患、また異常な Th2 細胞の変動により病態が進行する免疫疾患を示す。

本発明の抗体は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体またはペプチド製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体またはペプチドそのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体またはペプチドを微細な粒子として分散させ吸收を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体またはペプチドおよび用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人 1 回当たり  $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 8 \text{ mg}/\text{kg}$  である。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は KM2160 の化合物に対する ELISA 法における反応性を示した図である。

第 2 図はプラスミド pKM2160VH41 と pKM2160VL61 の造成工程を示した図である。

第 3 図はプラスミド pKANTEX2160H の造成工程を示した図である。

第 4 図はプラスミド pKANTEX2160 の造成工程を示した図である。

第 5 図は精製した抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の SDS-PAGE (5~20% グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した図である。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン 1 が高分子量マーカー、2 が KM2760、3 が低分子量マーカー、4 が KM2760 の泳動パターンをそれぞれ示す。

第 6 図は精製した抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の CCR4 部分ペプチドとの結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は CCR4 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。

第 7 図は蛍光抗体法を用いた、CCR4 高発現細胞 (CCR4/EL-4) に対する KM2760 の反応性を示した図である。

第 8 図は上図が CCR4/EL-4 細胞、下図が EL-4 細胞に対する ADCC 活性による細胞障害性を示した図である。

第 9 図は CD4 と CD45RA の染色性の違いによる 4 つの分画でのアネキシン V 陽性率による、ヒト PBMC に対する ADCC 活性による細胞障害性を示した図である。

第 10 図はヒト PBMC からの IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$  産生抑制効果を示した図である。

第 11 図は抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 のヒト T 細胞系白血病細胞株への反応性を示した図である。

第 12 図は抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 との反応性が確認されたヒト T 細胞系白血病細胞株に対する抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 による細胞障害性を示した図である。

第 13 図は抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 をカニクイザルに投与した時の IL-4 産生量の経時的変化を示した図である。

第 14 図は抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 をカニクイザルに投与した時の IL-13 産生量の経時的変化を示した図である。

第 15 図は抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 をカニクイザルに投与した時の IL- $\gamma$  産生量の経時的変化を示した図である。

第 16 図は hCCR4 高発現マウス由来細胞 CCR4/EL-4 細胞が皮下移植されたマウスに、抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 を投与した時の腫瘍体積の平均値の経時的変化を示した図である。

第 17 図は hCCR4 高発現マウス由来細胞 CCR4/EL-4 細胞が皮下移植されたマウスに、抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 を投与した時の投与群の腫瘍体積の平均値と非投与群の腫瘍体積の平均値の比の結果示した図である。

第 18 図は CCR4 を発現しているヒト T 細胞白血病株 CCRF-CEM 細胞 (ATCC CCL119) が皮下移植されたマウスに、抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 を投与した時の腫瘍体積の平均値の経時的変化を示した図である。

## 発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

### 実施例 1

#### マウス抗 CCR4 モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞の作製：

以下の手順に従い、マウス抗 CCR4 モノクローナル抗体、KM2160 (Int. Immunol., 11, 81 (1999) ) を產生するハイブリドーマ細胞を作製した。

##### (1) 抗原の調製

ヒト CCR4 (以下、hCCR4 と記す) 蛋白質のアミノ酸配列 (配列番号 17) を Genetyx Mac を用いて解析し、親水性の高い部分、N 末端、C 末端のなかから抗原として適當と考えられる部分配列として、化合物 1 (配列番号 1) を選択した。また、マウス CCR4 (以下、mCCR4 と記す) (BBRC, 218, 337 (1996) ) 蛋白質のアミノ酸配列中、化合物 1 に相当する部分を化合物 2 (配列番号 2) として選択した。配列番号 1 および 2 は、それぞれヒトおよびマウス CCR4 の N 末端アミノ酸から 2~29 番目に相当する。

略号本発明において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関する IUPAC-IUB 委員会 (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature) の勧告 (European Journal of Biochemistry, 138, 9 (1984) ) に従った。

以下の略号は、特に断わらない限り対応する下記のアミノ酸を表す。

Ala: L-アラニン

Asn: L-アスパラギン

Asp: L-アスパラギン酸

Asx: L-アスパラギン酸または L-アスパラギン

Cys: L-システィン

Gln: L-グルタミン

Glu: L-グルタミン酸

Glx: L-グルタミン酸または L-グルタミン

Gly: グリシン

Ile: L-イソロイシン

Leu: L-ロイシン

Lys: L-リジン

Met: L-メチオニン

Phe: L-フェニルアラニン

Pro: L-プロリン

Ser: L-セリン

Thr: L-スレオニン

Tyr: L-チロシン

Val: L-バリン

以下の略号は、対応する下記のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す。

Fmoc: 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル

tBu: t-ブチル

Trt: トリチル

Boc: t-ブチルオキシカルボニル

Fmoc-Thr (tBu)-OH: N<sub>α</sub>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-0-t-ブチル-L-スレオニン

Fmoc-Ser (tBu)-OH: N<sub>α</sub>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-0-t-ブチル-L-セリン

Fmoc-Tyr (tBu)-OH: N<sub>α</sub>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-0-t-ブチル-L-チロシン

Fmoc-Lys (Boc)-OH: N<sub>α</sub>-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sub>ε</sub>-t-ブチルオキシカルボニル-L-リジン

Fmoc-Asn(Trt)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N $\gamma$ -トリチル-L-アスパラギン

Fmoc-Gln(Trt)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N $\delta$ -トリチル-L-グルタミン

Fmoc-Asp(0tBu)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸- $\beta$ -t-ブチルエステル

Fmoc-Glu(0tBu)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-グルタミン酸- $\gamma$ -t-ブチルエステル

Fmoc-Cys(Trt)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-S-トリチル-L-システイン

以下の略号は、対応する下記の反応溶媒、反応試薬等を表す。

PyBOP: ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスフォニウムヘキサフルオロホスフェート

HOBr: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール

DMF: N,N-ジメチルホルムアミド

DCM: ジクロロメタン

TFA: トリフルオロ酢酸

NMM: N-メチルモルホリン

DTT: ジチオスレイトール

①化合物 1 (配列番号 1) (H-Asn-Pro-Thr-Asp-Ile-Ala-Asp-Thr-Thr-Leu-Asp-Glu-Ser-Ile-Tyr-Ser-Asn-Tyr-Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ser-Ile-Pro-Lys-Pro-Cys-OH) の合成

H-Cys(Trt)、16.8  $\mu$  mol が結合した担体樹脂 (クロロトリチル樹脂、AnaSpec 社製) 30 mg を自動合成機 (島津製作所社製) の反応容器に入れ、1 ml の DCM/DMF (1:1) を加えて 10 分間攪拌し溶液を排出し、さらに 1 ml の DMF を加えて 1 分間攪拌し溶液を排出した後、島津製作所の合成プログラムに従い次の操作を行った。

(a) Fmoc-Pro-OH (168  $\mu$  mol) 、 PyBOP (168  $\mu$  mol) 、 HOBt・1 水和物 (168  $\mu$  mol) および NMM (252  $\mu$  mol) を DMF (588.2  $\mu$  l) 中で 5 分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を 60 分間攪拌し、溶液を排出した。

(b) 担体樹脂を 707  $\mu$  l の DMF で 1 分間洗浄し、これを 5 回繰り返した。こうして、Fmoc-Pro-Cys(Trt)が担体上に合成された。

次に以下の Fmoc 基脱保護工程を行った。

(c) 30%ピペリジン-DMF 溶液 707  $\mu$  l を加えて混合物を 4 分間攪拌し、該溶液を排出し、この操作をもう 1 回繰り返した。

(d) 担体樹脂を 707  $\mu$  l の DMF で 1 分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を 5 回繰り返した。

こうして、Fmoc 基を除去した H-Pro-Cys(Trt)の結合した担体樹脂を得た。

次に、(a) の工程で Fmoc-Lys(Boc)-OH を用いて縮合反応を行い、(b) の洗浄工程、次いで(c)、(d) の脱保護工程を経て、H-Lys(Boc)-Pro-Cys(Trt)が担体上に合成された。以下、工程 (a) において、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Glu(0tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH を順次用いて、(a) ~ (d) を繰り返した。次に工程 (a) において Fmoc-Asn(Trt)-OH を用いて縮合反応を行い、(b) の洗浄工程を経て、再び工程 (a) の Fmoc-Asn(Trt)-OH を用いた縮合反応、(b) の洗浄工程を繰り返してから、(c)、(d) の脱保護工程を行った。引き続き、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Glu(0tBu)-OH、Fmoc-Asp(0tBu)-OH を順次用いて、(a) ~ (d) を繰り返した。次に工程 (a) において Fmoc-Leu-OH を用いて縮合反応を行い、(b) の洗浄工程を経て、再び工程 (a) の Fmoc-Leu-OH を用いた縮合反応、(b) の洗浄工程を繰り返してから、(c)、(d) の脱保護工程を行った。以降、工程 (a) で、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Asp(0tBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Asp(0tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH を順次用いて、(a)、(b) の縮合反応工程を 2 度繰り返した後に (c)、

(d) の脱保護工程を行うという一連の操作を繰り返した後、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下 12 時間乾燥して、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、TFA (90%)、チオアニソール (5%)、1,2-エタンジチオール (5%) からなる混合溶液 1 ml を加えて室温で 2 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約 10 ml を加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、減圧下乾燥させて、粗ペプチドとして 63.7 mg を取得した。この粗生成物を 60 mg の DTT 存在下 2 ml の DMF に溶解後、逆相カラム（資生堂社製、CAPCELL PAK C18 30mm I. D. × 25 mm）を用いた HPLC で精製した。0.1% TFA 水溶液に、TFA 0.1%を含む 90%アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220 nm で検出し、化合物 1 を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、化合物 1 を 2.5 mg 得た。

質量分析 (FABMS) ;  $m/z = 3227.5$  ( $M+H^+$ )

アミノ酸分析；Asx 4.8 (5), Glx 2.7 (2), Ser 3.1 (3), Thr 2.0 (3), Ala 1.1 (1), Pro 3.1 (3), Tyr 3.8 (4), Leu 2.2 (2), Lys 1.2 (1), Ile 3.0 (3), Cys 1.2 (1)

②化合物 2 (配列番号 2) (H-Asn-Ala-Thr-Glu-Val-Thr-Asp-Thr-Thr-Gln-Asp-Glu-Thr-Val-Tyr-Asn-Ser-Tyr-Tyr-Phe-Tyr-Glu-Ser-Met-Pro-Lys-Pro-Cys-OH) の合成  
H-Cys (Trt)、28.0  $\mu$ mol が結合した担体樹脂（クロロトリチル樹脂、AnaSpec 社製）50 mg を出発原料として、①と同様に、工程 (a) において、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Lys (Boc)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Ser (tBu)-OH、Fmoc-Glu (0tBu)-OH、Fmoc-Tyr (tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Tyr (tBu)-OH、Fmoc-Tyr (tBu)-OH を順次用いて、(a) ~ (d) を繰り返した。次に工程 (a) において Fmoc-Ser (tBu)-OH を用いて縮合反応を行い、(b) の洗浄工程を経て、再び工程 (a) の Fmoc-Ser (tBu)-OH を用いた縮合反応、(b) の洗浄工程を繰り返してから、(c)、(d) の脱保護工程を行った。続いて工程 (a) において Fmoc-Asn (Trt)-OH を用いて縮合反応を行い、(b) の洗浄工

程を経て、再び工程 (a) の Fmoc-Asn(Trt)-OH を用いた縮合反応、(b) の洗浄工程を繰り返してから、(c)、(d) の脱保護工程を行った。引き続き、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Glu(0tBu)-OH、Fmoc-Asp(0tBu)-OH を順次用いて、(a)～(d) を繰り返した。次に工程 (a) において Fmoc-Gln(Trt)-OH を用いて縮合反応を行い、(b) の洗浄工程を経て、再び工程 (a) の Fmoc-Gln(Trt)-OH を用いた縮合反応、(b) の洗浄工程を繰り返してから、(c)、(d) の脱保護工程を行った。以降、工程 (a) で、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Asp(0tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Glu(0tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH を順次用いて、(a)、(b) の縮合反応工程を 2 度繰り返した後に (c)、(d) の脱保護工程を行うという一連の操作を繰り返した後、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。①と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 96.3 mg を取得し、逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 2 を 5.8 mg 得た。

質量分析 (TOFMS) ;  $m/z = 3297.7$  ( $M+H^+$ )

アミノ酸分析; Asx 4.1 (4), Glx 4.3 (4), Ser 2.0 (2), Thr 4.6 (5), Ala 1.0 (1), Pro 2.2 (2), Tyr 3.9 (4), Val 1.9 (2), Met 1.0 (1), Phe 1.0 (1), Lys 1.1 (1), Cys 1.1 (1)

## (2) 免疫原の調製

実施例 1 の (1) で得られた hCCR4 部分ペプチドは、免疫原性を高める目的で以下の方法で KLH (カルビオケム社) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、KLH を PBS に溶解して 10 mg/ml に調整し、1/10 容量の 25 mg/ml MBS (ナカライテスク社) を滴下して 30 分間攪拌反応させた。あらかじめ PBS で平衡化したセファデックス G-25 カラムなどのゲルろ過カラムでフリーの MBS を除いて得られた KLH-MB 2.5 mg を 0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) に溶解したペプチド 1 mg と混合し、室温で 3 時間、攪拌反応させた。反応後、PBS で透析した。

### (3) 動物の免疫と抗体産生細胞の調整

実施例 1 の (2) で調製したペプチド-KLH コンジュゲート  $100 \mu\text{g}$  をアルミニウムグレル  $2 \text{ mg}$  および百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製)  $1 \times 10^9$  細胞とともに 5 週令雌マウス (Balb/c) に投与し、2 週間後より  $100 \mu\text{g}$  のコンジュゲートを 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。最終投与後 3 日目のマウスより脾臓を摘出し、MEM 培地 (日本製薬社製) 中で裁断し、ピンセットを用いて解した後、遠心分離 (1200 rpm、5 分間) して上清を除去後、3 ml のトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH 7.65) で 1~2 分間処理し、赤血球を除いた。更に、MEM 培地で 3 回洗浄した後、細胞融合に供した。

### (4) マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株 P3X63Ag8U.1 (ATCC CRL1597、以下、P3-U1 と表記する) を培養し、細胞融合における親株として用いた。

### (5) ハイブリドーマ細胞の作製

実施例 1 の (3) および (4) で得られた脾細胞と骨髄腫細胞を 10 : 1 になる様に混合し、遠心分離 (1200 rpm、5 分間) して上清を除去後、沈殿した細胞群に 37°C の条件下でポリエチレングリコール溶液 (2 g のポリエチレングリコール-1000、2 ml の MEM 培地および 0.7 ml の DMSO からなる溶液) を  $10^8$  個の脾細胞あたり 0.5 ml 加え、よく懸濁した。更に、1~2 分間毎に MEM 培地を 1~2 ml ずつ数回加え、最終的に MEM 培地で全量を 50 ml とした。遠心分離 (900 rpm、5 分間) して上清を除去後、100 ml の HAT 培地に懸濁し、96 ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) に  $100 \mu\text{l}$  / ウェルずつ分注して 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 37°C で 10~14 日間培養した。融合細胞の増殖が見られたウェルについて、培養上清中 hCCR4 部分ペプチド

(化合物 1) に対する結合活性を実施例 2 の 2 項 (3) に記載の ELISA 法により測定した。活性の認められたウェルについては、培地を HT 培地に変えて 1 回、更に、培地を正常培地に変えて 1 回、の計 2 回の限界希釈法によるクローニングを行った。この様にして、マウス抗体 KM2160 を生産するハイブリドーマ細胞 KM2160 を得た。第 1 図に示すように KM2160 は hCCR4 部分ペプチド (化合物 1) に特異的に反応した。

## 実施例 2

抗 CCR4 キメラ抗体の作製 1. 抗 CCR4 マウス抗体の V 領域をコードする cDNA の単離、  
解析：

### (1) 抗 CCR4 マウス抗体生産ハイブリドーマ細胞からの mRNA の調製

実施例 1 に記載されたハイブリドーマ細胞 KM2160 より mRNA を回収した。mRNA の調製キットである Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、ハイブリドーマ細胞 KM2160 の  $8 \times 10^7$  細胞より mRNA を約  $48 \mu\text{g}$  調製した。

### (2) 抗 CCR4 マウス抗体の H 鎮および L 鎮 cDNA ライブラリーの作製

実施例 2 の 1 項 (1) で取得した KM2160 の mRNA の  $5 \mu\text{g}$  から、cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、両端に EcoRI-NotI アダプターを有する cDNA を合成した。作製した cDNA を  $20 \mu\text{l}$  の滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgG 型抗体の H 鎮に対応する約 1.5 kb の cDNA 断片と  $\kappa$  型の L 鎮に対応する約 1.0 kb の cDNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いてそれぞれ回収した。次に、 $\lambda$  ZAPII Predigested EcoRI/CIAP-Treated Vector Kit (Stratagene 社製) を用いて、各々の約 1.5 kb の cDNA 断片  $0.1 \mu\text{g}$  および約 1.0 kb の cDNA 断片  $0.1 \mu\text{g}$  と、制限酵素 EcoRI で消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphatase で末端を脱リン酸化した  $\lambda$  ZAPII ベクター  $1 \mu\text{g}$  を、添付の使用説明書に従い、連結した。連結後の各々の反応液

のうち  $2.5 \mu 1$  を GigapackIII Gold Packaging Extract (Stratagene 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、 $\lambda$  ファージにパッケージングした後、適当量を大腸菌株 XL1-Blue (Biotechniques, 5, 376 (1987) ) に感染させて、KM2160 の H鎖 cDNA ライブライリーとして  $9.3 \times 10^4$  個、L鎖 cDNA ライブライリーとして  $7.4 \times 10^4$  個のファージクローンを取得した。次に各々のファージを、添付の使用説明書に従って、ナイロンメンブレンフィルターHybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech 社製) 上に固定した。

### (3) 抗CCR4マウス抗体のH鎖およびL鎖cDNAのクローニング

実施例2の1項(2)で作製したKM2160のH鎖cDNAライブライリーおよびL鎖cDNAライブライリーのナイロンメンブレンフィルターを、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、マウス抗体のC領域のcDNA (H鎖はマウスC $\gamma$ 1cDNAのBamHI-EcoRI断片 (EMBO J., 3, 2047 (1984) )、L鎖はマウスC $\kappa$ cDNAのHpaI-EcoRI断片 (Cell, 22, 197 (1980) ) をプローブとして検出し、プローブに強く結合したファージクローンをH鎖、L鎖各10クローン取得した。次に、 $\lambda$ ZAPII Cloning Kit (Stratagene 社製) の使用説明書に従い、*in vivo* excision法により各ファージクローンをプラスミドに変換した。こうして得られた各プラスミドに含まれるcDNAの塩基配列を、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems 社製) を用いて、同社のDNAシーケンサABI PRISM 377により解析した。その結果、cDNAの5'末端に開始コドンと推定されるATG配列が存在する完全長の機能的なH鎖cDNAを含むプラスミドpKM2160H4およびL鎖cDNAを含むプラスミドpKM2160L6を得た。

### (4) 抗CCR4マウス抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

プラスミドpKM2160H4に含まれていたH鎖V領域の全塩基配列を配列番号3に、それから推定されたH鎖V領域の全アミノ酸配列を配列番号15に、プラスミドpKM2160L6に含まれていたL鎖V領域の全塩基配列を配列番号4に、それから推定さ

れた L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列を配列番号 16 にそれぞれ示す。なお、配列番号 15 および 16 に記載したアミノ酸配列にそれぞれ対応する塩基配列は、配列番号 3 および 4 に記載したもの以外に無数に存在するが、それらはすべて本発明の範囲に包含される。既知のマウス抗体の配列データ (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991) ) との比較および精製した抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖および L 鎖の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (島津製作所社製 : PPSQ-10) を用いて解析した結果との比較から、単離した各々の cDNA は分泌シグナル配列を含む抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 をコードする完全長 cDNA であり、H 鎖については配列番号 15 に示したアミノ酸配列の 1 から 19 番目が、L 鎖については配列番号 16 に示したアミノ酸配列の 1 から 19 番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

次に、抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖および L 鎖の V 領域のアミノ酸配列の新規性について検討した。配列解析システムとして GCG Package (version 9.1, Genetics Computer Group 社製) を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベースを BLASTP 法 (Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997) ) により検索した。その結果、H 鎖、L 鎖ともに完全に一致する配列は認められず、抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域は新規なアミノ酸配列であることが確認された。

また、抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR を、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎖の V 領域の CDR1、CDR2 および CDR3 のアミノ酸配列を配列番号 5、6 および 7 に、L 鎖の V 領域の CDR1、CDR2 および CDR3 のアミノ酸配列を配列番号 8、9 および 10 にそれぞれ示した。

## 2. 抗 CCR4 キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

### (1) 抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160 の構築

WO97/10354 に記載のヒト IgG1、 $\kappa$ 型の抗体を発現できるヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93 と実施例 2 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM2160H4 および pKM2160L6 を用いて抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160 を以下の様にして構築した。

KM2160 の H 鎮 V 領域 cDNA を PCR 法によって得るために配列番号 11 と 12 に示した塩基配列を有する合成 DNA を、L 鎮 V 領域 cDNA を得るために配列番号 13 と 14 に示した塩基配列を有する合成 DNA を設計した。それぞれの合成 DNA は 5' 末端に pKANTEX93 へクローニングするための制限酵素認識配列を含んでおり、DNA の合成はジェンセックト社に委託した。実施例 2 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM2160H4 の 20 ng を 50  $\mu$ l の KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2 mM dNTPs、1 mM 塩化マグネシウム、0.5  $\mu$ M の配列番号 11 と 12 に示した塩基配列を有する合成 DNA を含む緩衝液に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社製) を用いて、94°Cにて 3 分間加熱した後、2.5 単位の KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、94°Cにて 30 秒間、58°Cにて 30 秒間、74°Cにて 1 分間のサイクルを 25 サイクル行った。同様に、実施例 2 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM2160L6 の 20 ng を 50  $\mu$ l の KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2 mM dNTPs、1 mM 塩化マグネシウム、0.5  $\mu$ M の配列番号 13 と 14 に示した塩基配列を有する合成 DNA を含む緩衝液に添加し、上記の方法で PCR 反応を行なった。該反応液 10  $\mu$ l をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.46 kb の H 鎮 V 領域 PCR 産物、約 0.43 kb の L 鎮 V 領域 PCR 産物をそれぞれ回収した。

次に、プラスミド pBluescript SK (-) (Stratagene 社製) を制限酵素 *Sma*I (宝酒造社製) で消化して得られた DNA 0.1  $\mu$ g と、上記で得られたそれぞれの PCR 産物約 0.1  $\mu$ g を滅菌水に加えて 7.5  $\mu$ l とし、TAKARA DNA Ligation Kit Ver. 2 の solution

I (宝酒造社製) 7.5  $\mu$  l、制限酵素 *Sma*I 0.3  $\mu$  l を加えて 22°Cで一晩反応させた。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する第 2 図に示したプラスミド pKM2160VH41 および pKM2160VL61 を得た。

次にヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 と上記で得られた pKM2160VH41 の 3  $\mu$  g をそれぞれ 30  $\mu$  l の 10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5) 、10 mM 塩化マグネシウムおよび 1 mM DTT からなる緩衝液に加え、更に 10 単位の制限酵素 *Apa*I (宝酒造社製) を加えて 37°Cで 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10  $\mu$  l の 50 mM トリス-塩酸 (pH 7.5) 、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT、100  $\mu$  g/ml BSA および 0.01% トライトン X-100 からなる緩衝液に加え、更に 10 単位の制限酵素 *Not*I (宝酒造社製) を加えて 37°Cで 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、pKANTEX93 の約 12.75 kb、pKM2160VH41 の約 0.44 kb の *Apa*I-*Not*I 断片をそれぞれ回収した。得られた 2 種類の断片を TAKARA DNA Ligation Kit Ver. 2 を用いて添付の説明書に従って連結し、得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA 各プラスミド DNA を調製して制限酵素処理により確認し、目的の約 0.44 kb の *Apa*I-*Not*I 断片が挿入された第 3 図に示したプラスミド pKANTEX2160H を得た。

次に上記で得られた pKANTEX2160H と pKM2160VL61 の 3  $\mu$  g を 50 mM トリス-塩酸 (pH 7.5) 、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT および 100  $\mu$  g/ml BSA からなる緩衝液に加え全量を 30  $\mu$  l とし、10 単位の制限酵素 *Bsi*WI (New England Biolabs 社製) を加えて 55°Cで 1 時間反応させた後、更に制限酵素 *Eco*RI (宝酒造社製) を加えて 37°Cで 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳

動にて分画し、pKANTEX2160H の約 13.20 kb、pKM2160VL61 の約 0.41 kb の *Eco*RI-*Bsi*WI 断片をそれぞれ回収した。得られた 2 種類の断片を TAKARA DNA Ligation Kit Ver. 2 を用いて添付の説明書に従って連結し、得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株（東洋紡績社製）を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製して制限酵素処理により確認し、目的の約 0.41 kb の *Eco*RI-*Bsi*WI 断片が挿入された第 4 図に示したプラスミド pKANTEX2160 を得た。該プラスミドに関して、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した結果、目的の KM2160H 鎖および L 鎖 V 領域 cDNA がクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

## (2) 抗 CCR4 キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

実施例 2 の 2 項 (1) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 を用いて抗 CCR4 キメラ抗体の動物細胞での発現を以下の様にして行った。

プラスミド pKANTEX2160 を制限酵素 *Aat*II (東洋紡績社製) で消化して直線化した後、10  $\mu$ g を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ細胞株 YB2/0 細胞 (ATCC CRL1662) へエレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133 (1990)) により導入後、40 ml の H-SFM (GIBCO-BRL 社製) 培地 (FCS を 5% 添加) に懸濁し、96 ウェルマイクロタイプレート (住友ベークライト社製) に 200  $\mu$ l／ウェルずつ分注した。5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 1 mg/ml になる様に添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエンツになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 2 の 2 項 (3) に示す ELISA 法 (二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG ( $\gamma$ ) 抗体を使用) により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子增幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418 を 1 mg/ml、

dhfr 遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素（以下、DHFR と表記する）の阻害剤であるメソトレキセート（以下、MTX と表記する：Sigma 社製）を 50 nM 含む H-SFM 培地に 1～ $2 \times 10^5$  細胞／ml になる様に懸濁し、24 ウェルプレート（Greiner 社製）に 1 ml ずつ分注した。5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1～2 週間培養して、50 nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点では培養上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 2 の 2 項（3）に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100 nM、200 nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 1 mg/ml、MTX を 200 nM の濃度で含む H-SFM 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、2 回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行い、抗 CCR4 キメラ抗体の発現の最も高い形質転換細胞クローンを KM2760 と命名した。KM2760 の抗 CCR4 キメラ抗体の発現量は約 5  $\mu$ g/10<sup>6</sup> 細胞/24 時間であった。また、KM2760 の抗体 H 鎮 C 領域はヒト IgG1 サブクラスである。なお、KM2760 は平成 12 年 2 月 24 日付で、通商産業省 工業技術院生命工学工業技術研究所（現・経済産業省 産業技術総合研究所 生命工学工業技術研究所）（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に FERM BP-7054 として国際寄託されている。

### （3）抗体の CCR4 部分ペプチドに対する結合活性の測定（ELISA 法）

アッセイ用の抗原には実施例 1 の（1）で得られた hCCR4 部分ペプチド（化合物 1）をサイログロブリン（以下、THY と表記する）とコンジュゲートしたものを用いた。作製方法は実施例 1 の（2）に記した通りであるが、架橋剤には MBS の代わりに 4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシリックアシッド N-ヒドロキシサクシンイミドエステル（SMCC、Sigma 社）を用いた。96 穴の EIA 用プレート（グラナー社）に、上述のように調製したコンジュゲートを 10  $\mu$ g/ml、50  $\mu$ l/ウェルで分注し、4°C で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1% BSA を含む PBS（以下、

1% BSA-PBS と表記する) を  $100\ \mu\text{l}$  /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1% BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清、精製したマウス抗体または精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を  $50\ \mu\text{l}$  /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを 0.05% Tween20 を含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) で洗浄後、マウス抗体を添加したウェルには 1% BSA-PBS で 400 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス Ig 抗体溶液 (DAKO 社製) を、ヒト型キメラ抗体を添加したウェルには 1% BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG ( $\gamma$ ) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、それぞれ  $50\ \mu\text{l}$  /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 (2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウムの 0.55 g を 1 L の 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素を  $1\ \mu\text{l}$  /ml で添加した溶液) を  $50\ \mu\text{l}$  /ウェルで加えて発色させ、415 nm の吸光度 (以下、OD415 と表記する) を測定した。

#### (4) 抗 CCR4 キメラ抗体の培養上清からの精製

実施例 2 の 2 項 (2) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローン KM2760 を MTX を 200 nM、Daigo's GF21 (和光純薬製) を 5% の濃度で含む H-SFM (GIBCO-BRL 社製) に  $1\sim2\times10^5$  細胞 / ml となる様に懸濁し、 $175\text{cm}^2$  フラスコ (Greiner 社製) に 100 ml ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 5~7 日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清約 200 ml より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 を精製し、約 1.9 mg の精製蛋白質を取得した。得られた抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の約  $3\ \mu\text{g}$  を、公知の方法 (Nature, 227, 680 (1970)) に従って電気泳動し、分子量および精製度を調べた。その結果を第 5 図に示した。第 5 図に示した様に、精製した抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 は、非還元条件下は約 150 キロダルトン (以下、Kd と表記する) であり、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが

認められた。これらの蛋白質の大きさは、KM2760 の H 鎮および L 鎮の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎮 : 49,226、L 鎮 : 24,168) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合 (以下、S-S 結合と表記する) が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎮と約 25Kd の分子量を持つ L 鎮に分解されるという報告 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988) 、 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996) ) と一致し、抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 が正しい構造の抗体分子として発現されていることが確認された。また、精製した抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の H 鎮および L 鎮の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (島津製作所社製 : PPSQ-10) を用いて解析した結果、抗 CCR4 マウス抗体 KM2160 の H 鎮および L 鎮の N 末端アミノ酸配列と一致することを確認した。

### 3. hCCR4 高発現細胞の確立

#### (1) 動物細胞用発現ベクターCAG-pcDNA3 の構築

動物細胞用発現ベクターpcDNA3 (INVITROGEN 社) のプロモーター領域をサイトメガロウィルス (CMV) から CAG (AG (モディファイド チキン  $\beta$  アクチン) プロモーター ウィズ CMV-IE エンハンサー) に変更した発現ベクター (CAG-pcDNA3) を作製し、CCR4 遺伝子を組み込むことで発現ベクターを以下のように構築した。

5  $\mu$  g の pcDNA3 を制限酵素 *Nru*I (宝酒造社製) で 37°C、1 時間反応させた後、エタノール沈殿により DNA 断片を回収した。次に制限酵素 *Hind*III (宝酒造社製) で 37°C、1 時間反応させ、アガロースゲル電気泳動にて分画後、CMV プロモーター領域を含まない約 5.8 kb の DNA 断片を回収した。3  $\mu$  g の CAG プロモーター (Nuc. Acid. Res., 23, 3816 (1995) ) 領域を有するプラスミド CAG-pBluescriptIIKS (+) を *Sac*II (宝酒造社製) で 37°C、1 時間反応後、エタノール沈殿により DNA 断片を回収した。DNA Blunting Kit (宝酒造社製) にて平滑末端化し、さらに *Hind*III で 37°C 1 時間反応し

てアガロースゲル電気泳動にて分画し、CAG プロモーター領域を含む約 1.8 kb の DNA 断片を回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて ligation し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド CAG-*pcDNA3* を得た。

### (2) hCCR4 発現ベクターの構築

実施例 2 の 3 項 (1) で得られた CAG-*pcDNA3* と hCCR4 DNA の組込まれた *pcDNA3 (CCR4/pcDNA3)* とを用いて以下のように hCCR4 発現ベクターを構築した。CAG-*pcDNA3*、CCR4/*pcDNA3* 共に *Hind*III で 37°C、1 時間反応させ、エタノール沈殿により DNA 断片を回収した。次に *Bg*III (宝酒造社製) で 37°C、1 時間反応させ、アガロースゲル電気泳動にて分画し、CAG プロモーター領域を含む約 2.0 kb の DNA 断片と hCCR4 遺伝子領域を含む約 5.5 kb の DNA 断片を回収した。以下、両 DNA 断片を実施例 2 の 3 項 (1) と同様の方法を用いて、プラスミド CAG-CCR4/*pcDNA3* を得た。

### (3) 動物細胞における hCCR4 の発現

動物細胞へのプラスミドの導入は、実施例 2 の 2 項 (2) と同様にエレクトロポレーション法にて行った。EL-4 細胞 (ATCC TIB-39) を PBS (−) (GIBCO BRL 社製) にて  $1 \times 10^7$  個/ $500 \mu\text{l}$  に懸濁し、実施例 2 の 3 項 (2) で得られた CAG-CCR4/*pcDNA3* を  $10 \mu\text{g}$  加えて氷上で 10 分間放置した後、専用キュベット (バイオラッド社製) に入れ、260V、 $500 \mu\text{FD}$  で遺伝子導入を行った。さらに 10 分間氷中にて放置した後、10% FCS-RPMI 培地 200 ml に懸濁し、96 ウェル細胞培養用プレートに  $200 \mu\text{l}$  / ウェルづつ分注した。24 時間後に培養上清を  $100 \mu\text{l}$  / ウェル除去し、 $1 \text{ mg}/\text{ml}$  の G418 を含む 10% FCS-RPMI 培地を  $100 \mu\text{l}$  / ウェルづつ分注し、最終濃度  $0.5 \text{ mg}/\text{ml}$  とした。2 週間後、数十株のシングルクローンを選択して拡大培養した。

#### (4) hCCR4 高発現細胞の選択

実施例 1 の (5) で作製された KM2160 を用いて、蛍光抗体法で選択した。選択した数十株の遺伝子導入細胞各  $2 \times 10^6$  個を 96 ウェル U 字プレートに分注した。公知の方法 (酵素抗体法: 学際企画刊 (1985)) でビオチン標識した KM2160 を FACS 用緩衝液 (1% BSA-PBS、0.02% EDTA、0.05%  $\text{NaN}_3$ 、pH 7.4) で  $5 \mu \text{g}/\text{ml}$  に、また非特異的な染色を防ぐために、ヒト IgG (ウェルファイド社製) を  $3.75 \text{ mg}/\text{ml}$  にそれぞれ希釈した抗体溶液を  $200 \mu \text{l}/\text{ウェル}$  として加え、氷中で 30 分間反応させた。陰性対象としては、ビオチン化抗 IL-5R 抗体 (W097/10354) を同濃度で用いた。緩衝液にて  $200 \mu \text{l}/\text{ウェル}$  で 2 回洗浄後、ストレプトアビジン-PE (日本ベクトン・ディッキンソン社製) を  $20 \mu \text{l}/\text{ウェル}$  加えた。遮光し氷中で 30 分間反応後、 $200 \mu \text{l}/\text{ウェル}$  で 3 回洗浄し、最終的に  $500 \mu \text{l}$  に懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定し、最も強い蛍光強度の株を 1 種類選択した。

### 実施例 3

#### 抗 CCR4 キメラ抗体の機能解析:

##### 1. 抗 CCR4 キメラ抗体の活性評価

###### (1) 抗 CCR4 キメラ抗体のヒトおよびマウス CCR4 に対する反応性 (ELISA 法)

精製した抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 のヒトおよびマウス CCR4 に対する反応性を実施例 2 の 2 項 (3) に示す ELISA 法により測定した。抗原としては実施例 1 の (1) で得られた hCCR4 部分ペプチド (化合物 1) および mCCR4 部分ペプチド (化合物 2) を THY とコンジュゲートしたものを用いた。作製方法は実施例 1 の (2) に記した通りであるが、架橋剤には MBS の代わりに SMCC (Sigma 社) を用いた。第 6 図は ELISA 用のプレートの各ウェルに吸着させる CCR4 ペプチドコンジュゲートの量を  $10 \mu \text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu \text{l}$  /ウェルに固定し、添加する抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の濃度を変化させて反応性を検討した結果である。第 6 図に示したように、抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 は、hCCR4 部分ペプチドと mCCR4 部分ペプチドに対して、ほぼ同等の結合活性を有していた。こ

の結果により、抗CCR4 キメラ抗体 KM2760 は、ヒトおよびマウスのCCR4 のN末端アミノ酸から2~29番目に存在するエピトープを認識することが明らかになった。

#### (2) 抗CCR4 キメラ抗体のhCCR4 高発現細胞との反応性（蛍光抗体法）

精製した抗CCR4 キメラ抗体 KM2760 と実施例2の3項(4)で作製したhCCR4 高発現細胞（以下、CCR4/EL-4と表記する）との反応性は、実施例2の3項(4)と同様の方法で測定した。第7図に示した様に、抗CCR4 キメラ抗体 KM2760 はCCR4/EL-4 細胞に対して強い反応を示した。

### 2. 抗CCR4 キメラ抗体の *in vitro* 細胞障害活性（ADCC活性）

実施例2の2項(4)で得られた精製CCR4 キメラ抗体の *in vitro* 細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC活性を測定した。

#### (1) 標的細胞溶液の調製

実施例2の3項(4)で得られたhCCR4 高発現細胞 CCR4/EL-4 を0.5 mg/ml のG418を含む10% FCS-RPMI1640 培地で培養し、 $1 \times 10^6$  細胞/ml となる様に調製し、放射性物質であるクロム酸ナトリウム ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ )（第一化学薬品社製）を1.85 MBq 当量加えて37°Cで1.5時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640 培地で懸濁および遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4°Cで30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、10% FCS-RPMI1640 培地を5 ml 加え、 $2 \times 10^6$  細胞/ml に調製し、標的細胞溶液とした。

#### (2) エフェクター細胞溶液の調製

ヘパリンナトリウム注射液（武田薬品社製）を200単位（ $200 \mu\text{l}$ ）入れた注射筒を用いて、健常人ヒト末梢血60 mlを採取した。その全量を等量の生理食塩液（大塚製薬社製）にて2倍に希釈し、120 mlとした。15 ml容量の遠心管（住友ベークライト

社製) 12 本にリンフォプレップ (NYCOMED 社製) を 5 ml ずつ分注し、その上から希釈した末梢血を 10 ml ずつ重層し、800×g、20 分間、室温で遠心分離した。血漿層とリンフォプレッップ層の間にある PBMC 画分をすべての遠心管より採取して 1% FCS を含む RPMI1640 培地 (GIBCO 社製) (以下、1% FCS-RPMI と表記する) に懸濁し、400×g、5 分間、4°Cで 2 回遠心洗浄して  $5 \times 10^6$  細胞/ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞とした。

### (3) ADCC 活性の測定

96 ウェル U 字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに実施例 3 の 2 項 (1) で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu l$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで実施例 3 の 2 項 (2) で調製したエフェクター細胞溶液を  $100 \mu l$  ( $5 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 50 : 1 となる) 添加した。更に、各種抗 CCR4 キメラ抗体を各最終濃度  $0.01 \sim 10 \mu g/ml$  となる様に加え、37°Cで 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、1 ウェルあたり  $100 \mu l$  の上清の  $^{51}Cr$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}Cr$  量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}Cr$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}Cr$  量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}Cr$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性は下式により求めた。

$$\text{細胞障害活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}Cr \text{ 量} - \text{自然解離 } ^{51}Cr \text{ 量}}{\text{全 } ^{51}Cr \text{ 量} - \text{自然解離 } ^{51}Cr \text{ 量}} \times 100$$

その結果を第 8 図に示した。第 8 図に示した様に、抗 CCR4 キメラ抗体は  $0.01$  から  $10 \mu g/ml$  の範囲で抗体濃度依存的に強い細胞障害活性を示した。陰性対象として遺伝子非導入株である EL-4 細胞の ADCC 活性を同様に測定したが、活性は確認されなかったため、この細胞障害活性は CCR4 特異的であることが示された。以上の結果は、抗

CCR4 キメラ抗体 KM2760 が効率よくヒトのエフェクター細胞を活性化して CCR4 を発現した Th2 細胞を減少もしくは除去でき、気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのヒトの Th2 介在性免疫疾患の診断もしくは治療に有用であることを示している。

#### 実施例 4

抗 CCR4 キメラ抗体のヒト末梢血に及ぼす影響：

(1) ヒト PBMC に対する ADCC 活性の測定

実施例 3 の 2 項 (2) と同様の方法で PBMC を分離し、最終的に  $1 \times 10^7$  細胞/ $\text{ml}$  の濃度で懸濁した。実施例 3 の 2 項 (3) で用いた U 字プレートに  $100 \mu\text{l}$  /ウェルずつ分注し、 $1 \times 10^6$  細胞 /ウェルとした。KM2760 と陰性対照である抗 IL-5 受容体抗体 (W097/10354) を  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に希釈し、細胞を分注したウェルに  $100 \mu\text{l}$  /ウェルずつ分注した。5%  $\text{CO}_2$  気流下、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養後、細胞を回収した。細胞障害性の検出は Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit (MBL 社製) を用いて、アネキシン V 陽性細胞を死細胞とした。 $400 \times g$ 、3 分間、 $4^\circ\text{C}$  で遠心分離し、 $5 \times 10^5$  細胞に対して  $200 \mu\text{l}$  のキットに付属している Binding buffer に懸濁した。その中に  $1 \mu\text{l}$  の Annexin V-EGFP 試薬を添加し、数回ピッティング後、遮光して 5 分間反応させた。反応終了後、 $400 \times g$ 、3 分間、 $4^\circ\text{C}$  で遠心分離し、上清を除いた。軽くボルテックスをかけてペレットを崩し、氷上にて冷却した  $2.5 \text{ mM CaCl}_2$  を含むメタノールを  $100 \mu\text{l}$  添加し、 $4^\circ\text{C}$ 、10 分間静置した。 $8000 \times g$ 、30 秒間で遠心分離し、上清を除去した。Binding buffer  $200 \mu\text{l}$  にて懸濁し、遠心洗浄を 2 回行った。上清を除去したペレットに PC5 標識抗 CD4 抗体 (coulter 社製) を  $10 \mu\text{l}$  、PE 標識抗 CD45RA 抗体 (coulter 社製) を  $20 \mu\text{l}$  、 $2.5 \text{ mM CaCl}_2$  を含む FACS 用緩衝液を  $20 \mu\text{l}$  添加し、 $4^\circ\text{C}$ 、30 分間反応させた。その後  $2.5 \text{ mM CaCl}_2$  を含む FACS 用緩衝液で 3 回遠心洗浄し、フローサイトメーター (coulter 社製) で解析した。まず CD4 と CD45RA の染色性の違いにより細胞集団を 4 つに分画した (CD4+CD45RA+、CD4+CD45RA-、CD4-CD45RA+、CD4-CD45RA-)。次に各分画でのアネキシン V 陽性率を測定し、細胞障害%とした。その結果を第 9 図

に示した。PBMC は KM2760 と共に培養した場合にのみ細胞障害性が観察され、またその障害性は CCR4 陽性細胞の属する CD4+CD45RA-分画に特異的に検出された。

## (2) ヒト PBMC からのサイトカイン産生抑制効果

実施例 3 の 2 項 (3) と同様にして PBMC と KM2760 (最終濃度  $10 \mu \text{g}/\text{ml}$ ) を 24 時間共培養し、ADCC 活性を誘導した。培養後、上清を  $100 \mu \text{l}$  除去し、代わりに  $1 \mu \text{g}/\text{ml}$  の PMA (ホルボール・ミリステート・アセテート) と  $200 \text{ ng}/\text{ml}$  の A23187 (カルシマシン) (RBI 社製) を含んだ培地  $100 \mu \text{l}$  を加え、最終濃度を PMA が  $0.5 \mu \text{g}/\text{ml}$ 、A23187 が  $100 \text{ ng}/\text{ml}$  とし、細胞を刺激してサイトカイン産生を誘導させた (条件①)。別の刺激条件として、A23187 の代わりに抗 CD3 抗体である OKT-3 (ATCC CRL-8001) を最終濃度  $50 \text{ ng}/\text{ml}$  でサイトカイン産生を誘導させた (条件②)。各刺激剤導入後、24 時間培養した後に培養上清を回収してサイトカイン測定キット (バイオソース社製) にて IL-4、IL-5、IL-13、インターフェロン (IFN)- $\gamma$  を測定した。第 10 図に示すように、KM2760 添加群では著明に Th2 サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 の産生が抑制されたが、Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  は影響なかった。

## 実施例 5

抗 CCR4 キメラ抗体のヒト T 細胞系白血病細胞株への反応性：

### (1) 膜表面上への結合性 (蛍光抗体法)

抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 と以下のヒト T 細胞系白血病細胞株 8 株、HPB-ALL (Cancer Research, 54, 1511 (1994) ; 急性 T 細胞系白血病)、HSB-2 (ATCC CCL-120.1 ; 白血病 (T 細胞))、MOLT-4 (JCRB9031 ; リンパ腫 (T 細胞))、TALL-1 (JCRB0086 ; 白血病 (T 細胞))、Jurkat (ATCC TIB-152 ; 急性 T 細胞系白血病)、CCRF-CEM (ATCC CCL-119 ; 急性 T 細胞系白血病)、PEER (JCB0830、白血病 (T 細胞))、Hut78 (ATCC TIB-161 ; 皮膚 T 細胞系リンパ腫) との反応性を、実施例 2 の 3 項 (4) と同様の方法で測定した。但しビオチン化 KM2760 の濃度は  $10 \mu \text{g}/\text{ml}$  とした。

第 11 図に示したように、抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 は 8 株中 5 株 (HPB-ALL、Jurkat、CCRF-CEM、PEER、Hut78) に対して強い反応性を示した。

## (2) ADCC 活性

実施例 5 の 1 項で抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 での反応性が確認された細胞株 5 株に対する ADCC 活性の測定を実施例 3 の 2 項と同様の方法で測定した。第 12 図に示したように、全細胞について抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 は濃度依存的に障害した。

## 実施例 5

抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 のインビボ (*in vivo*) における活性評価 (Th2 サイトカインの產生抑制) :

実施例 2 の 2 項(4)で得られた精製抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の *in vivo* における活性を評価するため、カニクイザルに単回静脈内投与後、経日的に約 1 か月間にわたって採血を行い、PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Sigma 社製) および IONOMYCIN (Sigma 社製) 刺激によって末梢血白血球にサイトカイン產生を誘導し、Th2 サイトカインである IL-4 および IL-13 と Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  を測定した。以下に方法と結果を記す。

精製抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の投与量 (蛋白量) はそれぞれ 0.1 mg/kg、1.0 mg/kg、および 10 mg/kg であり、各用量群とも 2 匹の 4 歳齢雄カニクイザルに単回静脈内投与を行った。採血は、投与前、投与後 1 週目、2 週目、3 週目、4 週目に大腿静脈より行った。抗凝固剤にはヘパリン (ヘパリンナトリウム注射液, 1000 units/ml, 清水製薬株式会社製) を用い、血液 1 ml に対しヘパリン 25 units の濃度になるよう添加した。平底 24 ウェルプレートを用い、各個体の末梢血を 500  $\mu$  l/ウェルの容量で 2 ウェルに分注した。一方には刺激剤 (PMA 終濃度 50 ng/ml, IONOMYCIN 終濃度 1  $\mu$  g/ml) を含む培地を、残りの一方には刺激剤を含まない培地をそれぞれ 500  $\mu$  l/ウェル加え、軽く攪拌し、5% CO<sub>2</sub>、95% 空気、37°Cで 24 時間培養した。なお、用

いた培地は、RPMI1640 (GIBCO BRL 社製) 100 ml に対し、ペニシリン・ストレプトマイシン液 (GIBCO BRL 社製) 0.5 ml、非働化済牛胎児血清 (PAA laboratories 社製) 5.6 ml を添加したものである。培養終了後、各ウェルより血球ごと培養液を回収し、遠心分離 (6700×g, 5 分, 4°C) によって上清を得た。このようにして得られた培養上清に含まれる IL-4、IL-13、および IFN- $\gamma$  は、それぞれのサイトカイン測定キット (IL-4 : OptEIA Human IL-4 Kit, PharMingen 社製； IL-13 : Cyto screen Human IL-13 Immunoassay Kit, BioSource International 社製； IFN- $\gamma$  : Cyto screen Human IFN- $\gamma$  Immunoassay Kit, BioSource International 社製) を用いて定量した。各個体のサイトカインの産生量は、刺激剤を添加した量から刺激剤を添加しなかった量を差し引いた値である (0.1 mg/kg 群 個体番号 L-1, L-2, 1.0 mg/kg 群 個体番号 M-1, M-2, 10 mg/kg 群 個体番号 H-1, H-2)。その結果を第 13 図から第 15 図に示した。これらの図は、各個体毎に IL-4、IL-13、および IFN- $\gamma$  のそれぞれについて投与前の値を 100% として、投与後の産生量を百分率で表したものである。Th2 サイトカインである IL-4 (第 13 図) および IL-13 (第 14 図) はすべての投与群において、投与後 1 週目から著明に減少し、投与後 4 週目においてもその抑制は継続した。一方、Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  (第 15 図) への影響は極めて小さいものであった。

以上の結果から、抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 をカニクイザルに投与すると、少なくとも 4 週間は末梢血単核球からの Th2 サイトカインの産生が抑制されることが明らかとなった。また、抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 がカニクイザル生体内において、CCR4 を発現した末梢血中の Th2 細胞を減少もしくは除去したことが示された。

## 実施例 6

### 抗 CCR4 キメラ抗体の *in vivo* 抗腫瘍活性：

(1) 同系・腹腔内移植モデルに対する抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の抗腫瘍効果

実施例 2 の 2 項 (4) で得られた hCCR4 高発現マウス由来細胞 CCR4/EL-4 細胞を、マウスに腹腔内移植したマウス同系腫瘍モデルに対する抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の

抗腫瘍効果を測定した。マウスは 8 週令、雄の C57BL/6 マウス（日本クレア）を用いた。C57BL/6 マウス 10 匹の腹腔内に PBS（-）（Gibco BRL 社製）で  $1 \times 10^5$  個/ml に懸濁した CCR4/EL-4 細胞を  $200 \mu l$  / 匹で移植した。その内の 5 匹に移植 4 時間後、3 日後、6 日後、10 日後にクエン酸緩衝液（pH 6 に調整した 10 mmol/l クエン酸、150 mmol/l 塩化ナトリウム水溶液）で 2 mg/ml に希釈した KM2760 を腹腔内に  $200 \mu l$  投与した。残りの 5 匹はキメラ抗体を投与しない陰性対照群とした。移植当日より各群のマウスが腹水を伴う癌の増殖によって死亡するまでの日数を表 1 に示す。陰性対照群の平均生存日数が 16.4 日であったのに対し、KM2760 投与群の平均生存日数は 26.2 日であった。KM2760 投与により 59.8% の生存期間の延長が認められ、KM2760 は CCR4 発現白血病細胞の同系・腹腔内移植モデルに対して延命効果を示した。

表 1

	生存日数（日）	平均値（日）	延命率（%）
陰性対照群	14/14/16/18/20	16.4	
KM2760 投与群	21/22/23/29/36	26.2	59.8

## （2）同系・皮下移植モデルに対する抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の抗腫瘍効果

実施例 2 の 2 項（4）で得られた hCCR4 高発現マウス由来細胞 CCR4/EL-4 細胞を、マウスに皮下移植したマウス同系腫瘍モデルに対する抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の抗腫瘍効果を測定した。マウスは 8 週令、雄の C57BL/6 マウス（日本クレア）を用いた。C57BL/6 マウス 18 匹の腹側部の皮下に PBS（-）（Gibco BRL 社製）で  $1 \times 10^6$  個/ml に懸濁した CCR4/EL-4 細胞を  $50 \mu l$  / 匹で移植した。うち 5 匹には移植 4 時間後、1 日 1 回、5 日間連続で、クエン酸緩衝液（pH 6 に調整した 10 mmol/l クエン酸、150 mmol/l 塩化ナトリウム水溶液）で 2 mg/ml に希釈した KM2760 を尾静脈より  $100 \mu l$  投与した。この時 1 回あたりの投与量は  $200 \mu g$  / 匹となる。また別の 6 匹には移植 4 時間後、7 日後、14 日後にクエン酸緩衝液で 2 mg/ml に希釈した KM2760 を尾静

脈より  $200\mu\text{l}$  投与した。この時 1 回あたりの投与量は  $400\mu\text{g}/\text{匹}$  となる。残りの 7 匹はキメラ抗体を投与しない陰性対照群とした。移植後 6 日目より経時的にノギスによる腫瘍径の測定を行い、抗腫瘍効果の判定は、各投与群の腫瘍体積の平均値と非投与群の腫瘍体積の平均値に対する比、および投与開始後の生存日数で判定した。

腫瘍体積は下式にて算出した。

$$\text{腫瘍体積} = (\text{短径})^2 \times \text{長径} \times 0.5$$

各群の腫瘍体積の平均値を表 2 及び第 16 図、各群の腫瘍体積の平均値と非投与群の腫瘍体積の平均値の比の結果を表 3 及び第 17 図に示す。移植後 18 日目における各 KM2760 投与群の腫瘍体積の平均値と非投与群の腫瘍体積の平均値に対する比は、 $200\mu\text{g}$  の 5 日間連続投与群が 0.356、 $400\mu\text{g}$  の 3 回投与群が 0.257 であり、いずれの投与スケジュールにおいても KM2760 は CCR4 陽性白血病細胞の同系・皮下移植モデルに対して増殖抑制効果を示した。

表 2

群構成	移植後の日数					
	0	6	10	12	15	18
陰性対照群	50±0	46±28	294±114	778±263	1825±708	3581±1279
KM2760 $200\mu\text{g} \times 5$ 日間連続投与群	50±0	16±20	115±60	299±194	601±429	1274±886
KM2760 $400\mu\text{g} \times 3$ 回投与群	50±0	0±0	73±49	198±158	431±467	920±1163

単位 :  $\text{mm}^3 \pm \text{標準偏差}$

表 3

群構成	移植後の日数					
	0	6	10	12	15	18
陰性対照群	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
KM2760 $200\mu\text{g} \times 5$ 日間連続投与群	1.000	0.348	0.393	0.384	0.330	0.356
KM2760 $400\mu\text{g} \times 3$ 回投与群	1.000	0.000	0.250	0.254	0.236	0.257

### (3) 異種移植モデルに対する抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の抗腫瘍効果

CCR4 を発現しているヒト T 細胞白血病株 CCRF-CEM 細胞 (ATCC CCL119) をヌードマウスの皮下に移植したマウス異種移植・皮下腫瘍モデルに対する抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760 の抗腫瘍効果を測定した。マウスは 8 週令、雄の Balb/c ヌードマウス (日本クレア) を用いた。Balb/c ヌードマウス 20 匹の腹側部の皮下に RPMI1640 培地 (Gibco BRL 社製) で  $1 \times 10^8$  個/ml に懸濁した CCRF-CEM 細胞を  $200 \mu l$  / 匹で移植した。その後 5 匹ずつ 4 群に分け、うち 3 群には移植 4 時間後、3 日後、6 日後にそれぞれクエン酸緩衝液で 2 mg/ml、0.5 mg/ml あるいは 0.2 mg/ml に希釈した KM2760 を尾静脈より  $200 \mu l$  投与した。この時、各群の KM2760 投与量は  $400 \mu g$  / 匹 / 日、 $100 \mu g$  / 匹 / 日、 $40 \mu g$  / 匹 / 日となる。残りの 1 群はクエン酸緩衝液で 2 mg/ml に希釈したヒトイムノグロブリン G (以下 hIgG、ウェルファイド社製) を尾静脈より  $200 \mu l$  投与し ( $400 \mu g$  / 匹 / 日) 、陰性対照群とした。移植後 4 日目より経時的にノギスによる腫瘍径の測定を行い、抗腫瘍効果の判定は各群の腫瘍体積で判定した。腫瘍体積は下式にて算出した。

$$\text{腫瘍体積} = (\text{短径})^2 \times \text{長径} \times 0.5$$

各群の腫瘍体積の平均値の経時的变化を表 4 及び第 18 図に示す。KM2760 のいずれの投与群においても腫瘍増殖の完全な抑制が認められ、KM2760 は CCR4 陽性白血病細胞の異種移植・皮下腫瘍モデルに対する増殖抑制効果を示した。

表 4

群構成	移植後の日数					
	0	6	10	12	15	18
陰性対照群	0±0	44±63	204±159	233±157	364±86	448±142
KM2760 40 $\mu g$ 投与群	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
KM2760 100 $\mu g$ 投与群	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
KM2760 400 $\mu g$ 投与群	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

単位 :  $\text{mm}^3 \pm \text{標準偏差}$

## 産業上の利用可能性

本発明により、ヒト CCR4 に特異的に結合し、CCR4 に対する新規な CDR を含む、遺伝子組換え抗体およびその抗体断片が提供される。本発明の抗体は免疫細胞染色におけるヒト Th2 細胞の免疫学的検出、気管支喘息、アトピー性皮膚炎などを始めとするすべての Th2 介在性免疫疾患や異常な Th2 細胞のバランスにより病態が進行する疾患、白血病のような血液癌を始めとする癌疾患の診断あるいは治療に有用である。

## 配列フリーテキスト

配列番号 11—人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 12—人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 13—人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 14—人工配列の説明：合成 DNA

## 請 求 の 範 囲

1. ヒト CCR4 の細胞外領域に対して、特異的に反応する遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。
2. 細胞外領域が、配列番号 17 で示されるアミノ酸配列の 1～39、98～112、176～206 および 271～284 番目からなる群から選ばれる細胞外領域である請求の範囲 1 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。
3. 配列番号 17 で示されるアミノ酸配列の 2～29 番目に存在するエピトープを認識する請求の範囲 1 または 2 に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。
4. CCR4 発現細胞に特異的に反応する請求の範囲 1～3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。
5. CCR4 発現細胞に対し細胞障害活性を示す請求の範囲 1～4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。
6. CCR4 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞障害活性を示す請求の範囲 5 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。
7. 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性である請求の範囲 5 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

8. 抗体依存性細胞障害活性が Th2 細胞のアポトーシスを誘導することによるものである、請求の範囲 7 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

9. Th2 細胞を除去する作用を示す抗体である請求の範囲 1～8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

10. Th2 サイトカイン産生抑制活性を示す請求の範囲 1～9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

11. Th2 サイトカインが、IL-4、IL-5、または IL-13 である請求の範囲 10 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

12. 遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体またはヒト抗体から選ばれる請求の範囲 1～11 のいずれかに記載の遺伝子組換え抗体。

13. ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型 CDR 移植抗体である請求の範囲 12 記載の遺伝子組換え抗体。

14. ヒト抗体 IgG 型に属する請求の範囲 1～13 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体。

15. ヒト化抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む請求の範囲 12 記載の遺伝子組換え抗体。

16. ヒト型キメラ抗体が、CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) と抗体軽鎖 (L鎖) V領域と、ヒト抗体の H鎖定常領域 (C領域) と L鎖 C領域からなる請求の範囲 13 記載の遺伝子組換え抗体。

17. ヒト型キメラ抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H鎖 V領域の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L鎖 V領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む請求の範囲 16 記載の遺伝子組換え抗体。

18. ヒト型キメラ抗体が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 20~138 番目からなる H鎖 V領域、および配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 20~132 番目からなる L鎖 V領域を含む請求の範囲 16 記載の遺伝子組換え抗体。

19. ヒト型キメラ抗体が、形質転換体 KM2760 (FERM BP-7054) が生産する、抗体 H鎖 C領域がヒト IgG1 サブクラスである、抗体 KM2760 である請求の範囲 13 記載の遺伝子組換え抗体。

20. ヒト型 CDR 移植抗体が、CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) と抗体軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) と、ヒト抗体の H鎖および L鎖の C領域および V領域フレームワーク領域からなる請求の範囲 13 記載の遺伝子組換え抗体。

21. ヒト型 CDR 移植抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H鎖 V領域の CDR1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L鎖 V領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む請求の範囲 20 記載の遺伝子組換え抗体。

22. 請求の範囲 1~21 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片をコードする DNA。
23. 請求の範囲 22 記載の DNA とタンデム型ヒト化抗体発現用ベクターを含む組換えベクター。
24. 請求の範囲 23 記載の組換えベクターが宿主細胞に導入された形質転換体。
25. 形質転換体が KM2760 (FERM BP-7054) である請求の範囲 24 記載の形質転換体。
26. 請求の範囲 24 または 25 記載の形質転換体を培養して培養液中に遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を生成・蓄積させ、該培養液から該抗体またはその抗体断片を回収する、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の製造方法。
27. ヒト抗体が、抗体の抗体重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) と抗体軽鎖 (L鎖) V領域を含む請求の範囲 12 記載の遺伝子組換え抗体。
28. ヒト抗体の H鎖 V領域および L鎖 V領域の相補性決定領域 (CDR) が、それぞれ CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H鎖 V領域および L鎖 V領域の CDR のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む請求の範囲 27 記載の遺伝子組換え抗体。
29. ヒト抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H鎖 V領域の CDR1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ

酸配列からなる H 鎖 V 領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む請求の範囲 28 記載の遺伝子組換え抗体。

30. ヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域が、それぞれ CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む請求の範囲 27 記載の遺伝子組換え抗体。

31. ヒト抗体が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 20~138 番目からなる H 鎖 V 領域、または配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 20~132 番目からなる L 鎖 V 領域を含む請求の範囲 30 記載の遺伝子組換え抗体。

32. ヒト抗体が、ヒト抗体ファージライブラリーまたはヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体である請求の範囲 27~31 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体。

33. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化 V 領域断片、または抗体の相補性決定領域 (CDR) を含むペプチドである請求の範囲 1~11 のいずれか 1 項に記載の抗体断片。

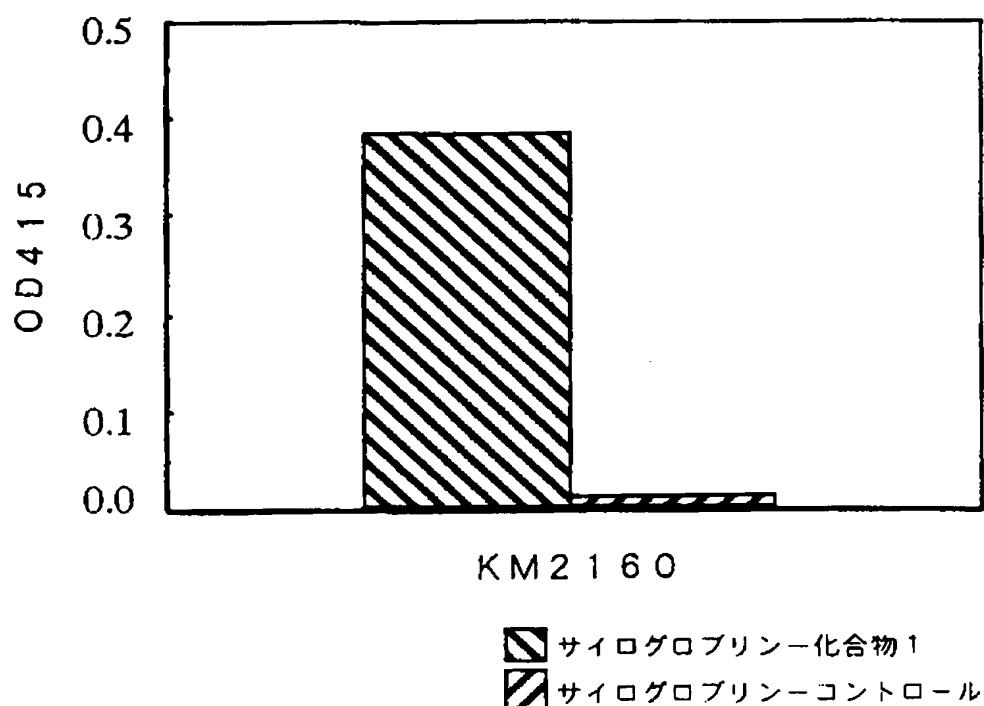
34. 抗体断片が、抗体の抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) と抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域を含む請求の範囲 33 記載の抗体断片。

35. 抗体断片の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域 (CDR) が、それぞれ CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の CDR のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む請求の範囲 34 記載の抗体断片。

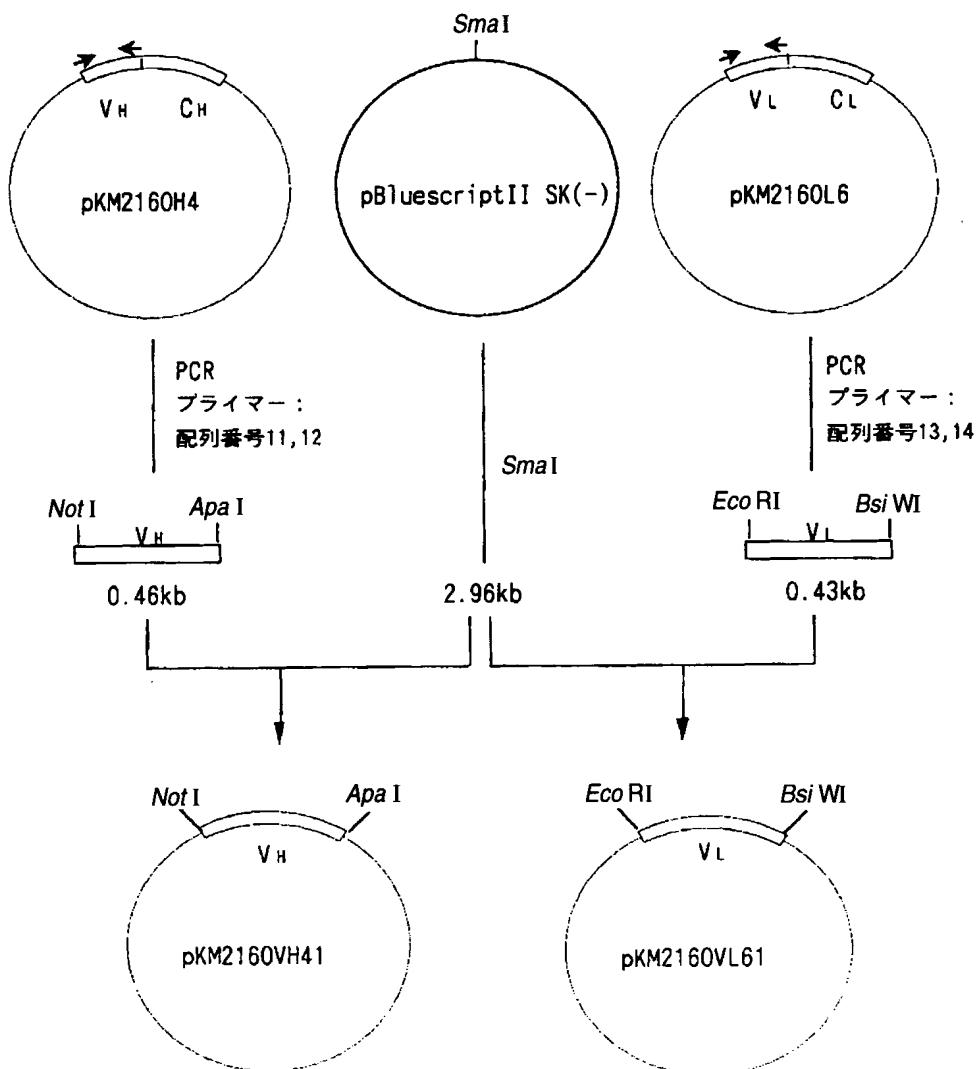
36. 抗体断片が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H鎖 V 領域の CDR1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L鎖 V 領域の CDR1、CDR2、CDR3 を含む請求の範囲 35 記載の抗体断片。
37. 抗体断片の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域が、それぞれ CCR4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H鎖 V 領域および L鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む請求の範囲 34 記載の抗体断片。
38. 抗体断片が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 20~138 番目からなる H鎖 V 領域、および配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 20~132 番目からなる L鎖 V 領域を含む請求の範囲 37 記載の抗体断片。
39. 請求の範囲 1~21、27~38 のいずれか 1 項に記載された遺伝子組換え抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と化学的または遺伝子工学的に結合している遺伝子組換え抗体または抗体断片。
40. 請求の範囲 1~21、27~39 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、CCR4 を免疫学的に検出する方法。
41. 請求の範囲 1~21、27~39 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、CCR4 を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。
42. 請求の範囲 1~21、27~39 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、CCR4 を細胞表面に発現した細胞を減少または除去する方法。

43. 請求の範囲 1～21、27～39 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、Th2 サイトカインの產生を抑制する方法。
44. 請求の範囲 1～21、27～39 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする医薬。
45. 請求の範囲 1～21、27～39 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする Th2 介在性免疫疾患の治療または診断剤。
46. 請求の範囲 1～21、27～39 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする血液癌の治療または診断剤。
47. 血液癌が白血病である請求の範囲 46 記載の治療または診断剤。

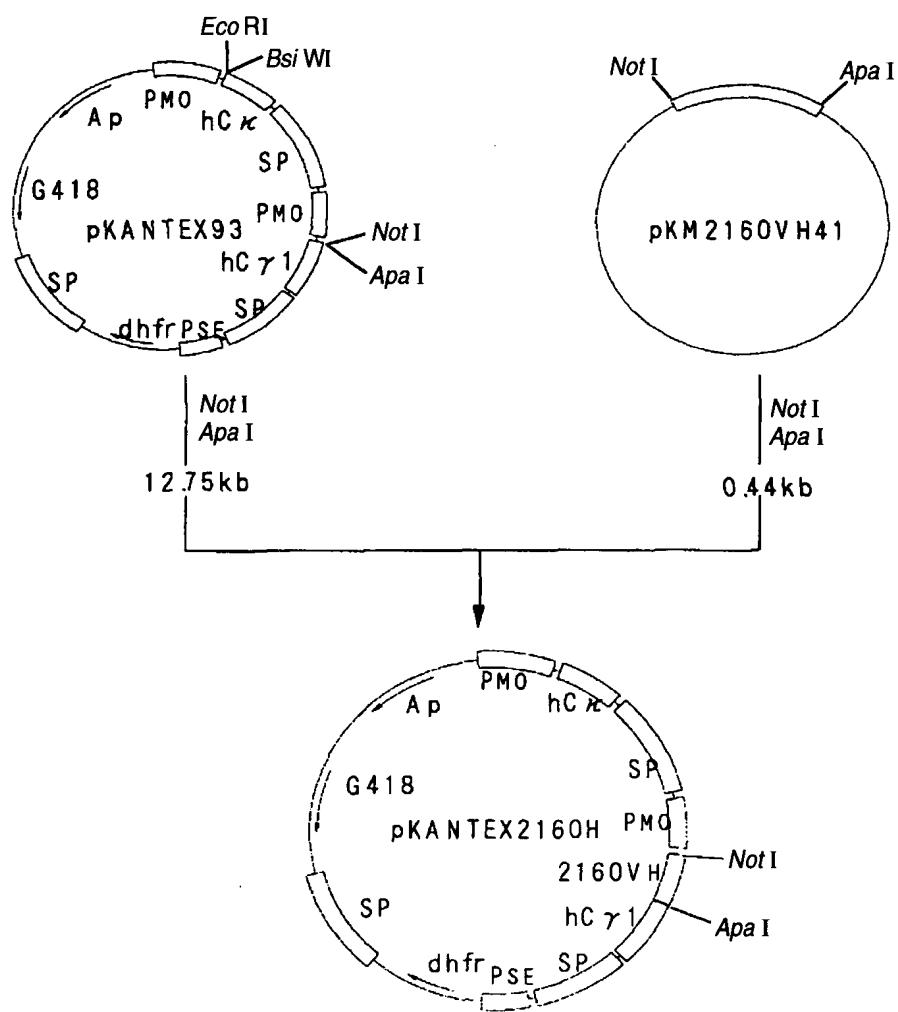
## 第 1 図



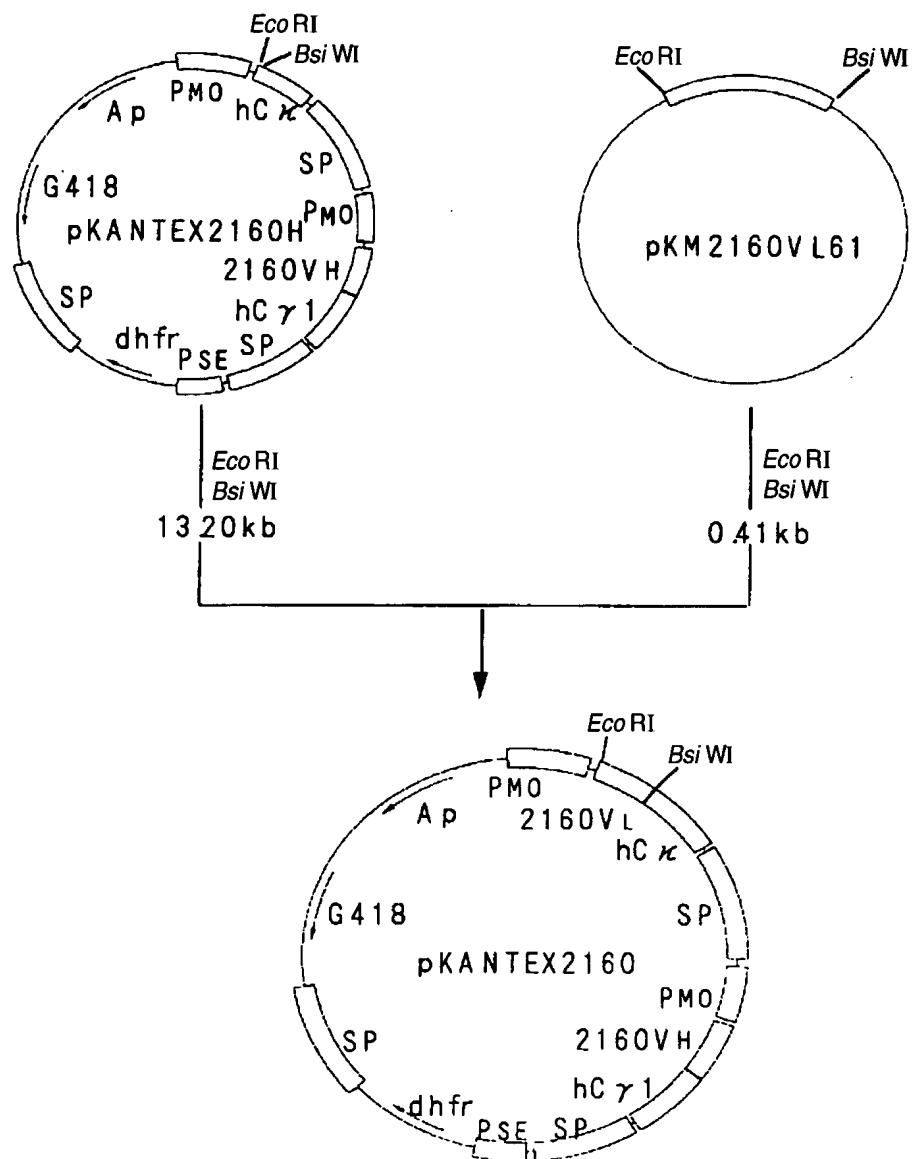
## 第2図



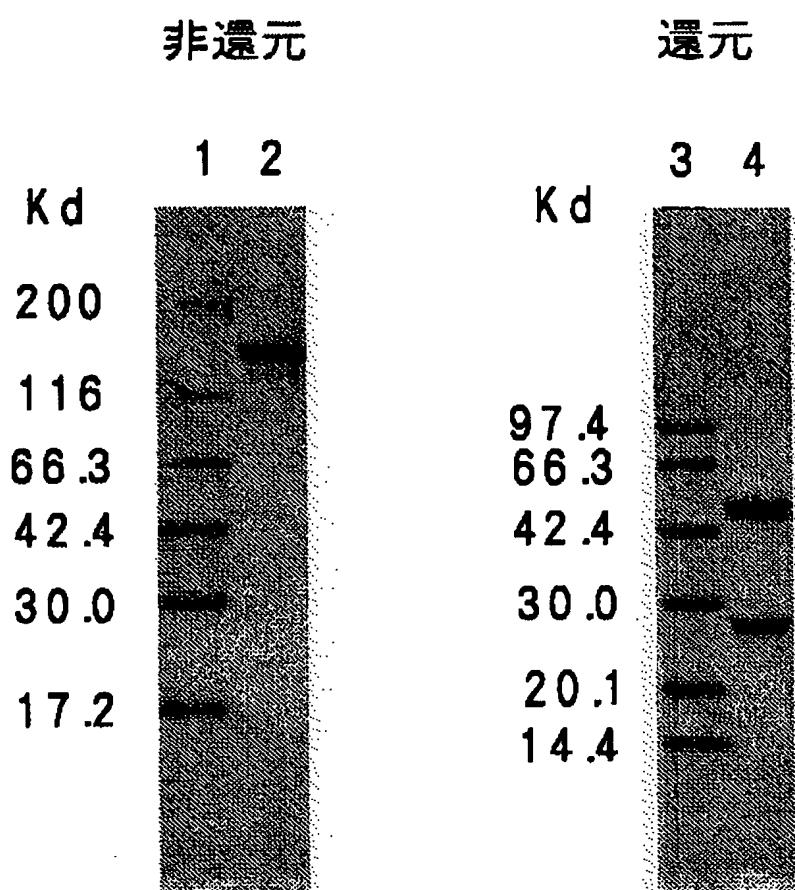
## 第3図



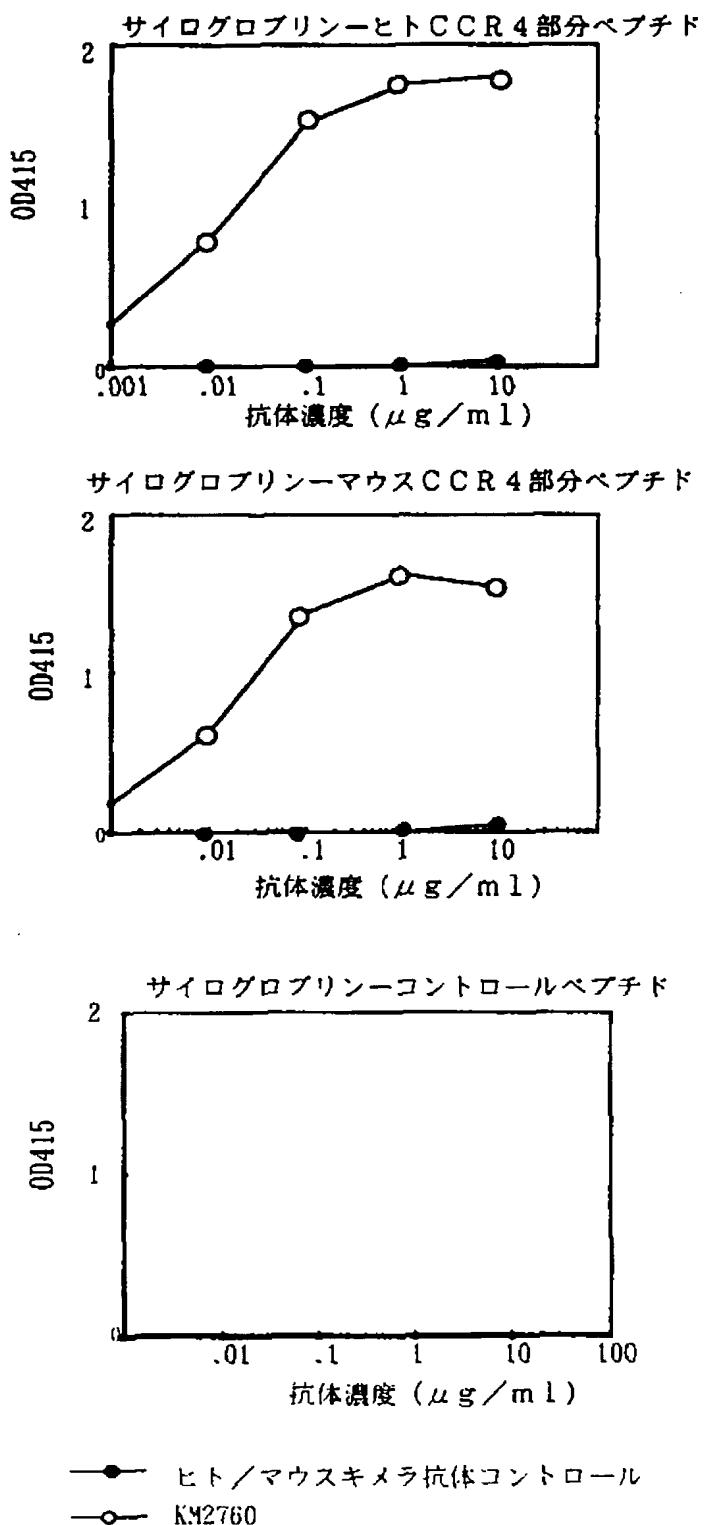
## 第4図



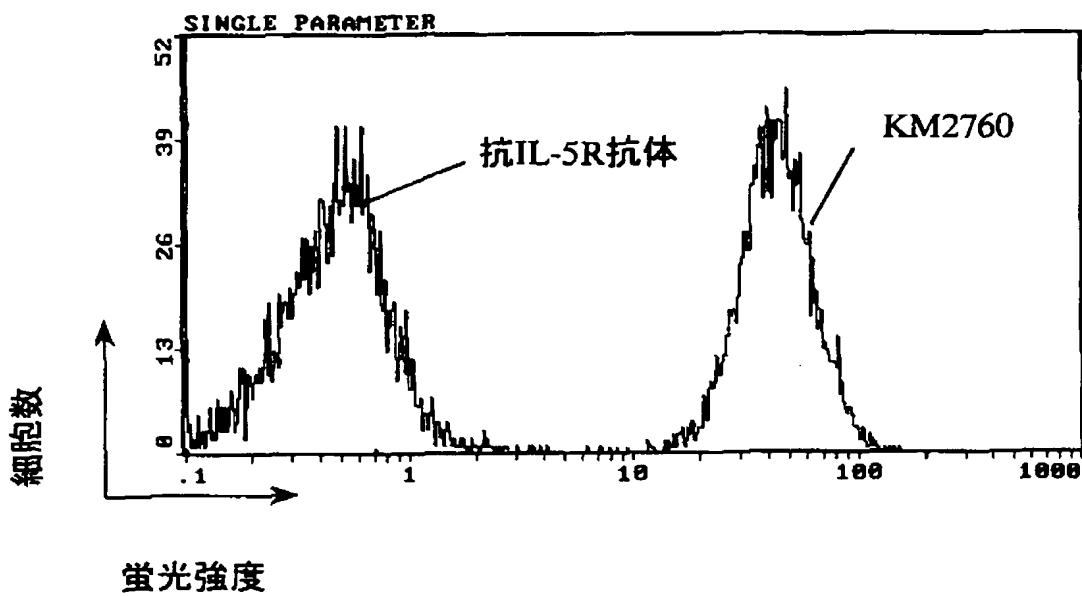
## 第5図



## 第6図

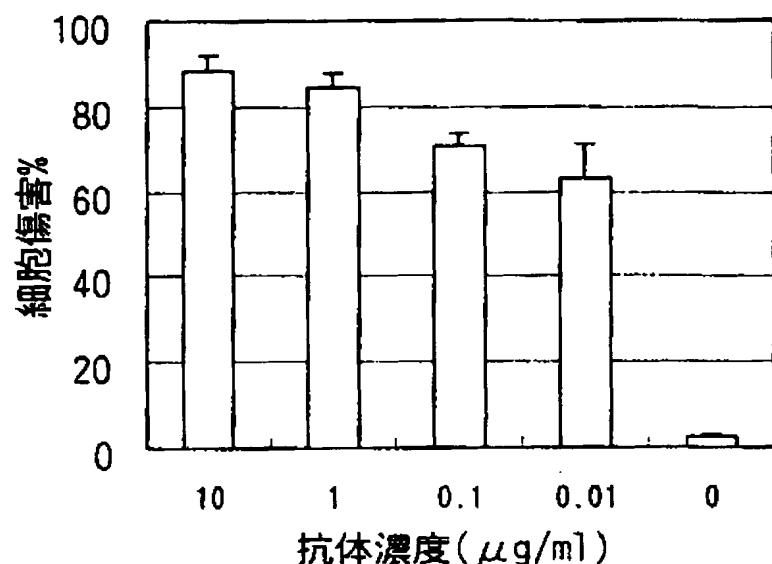


## 第7図

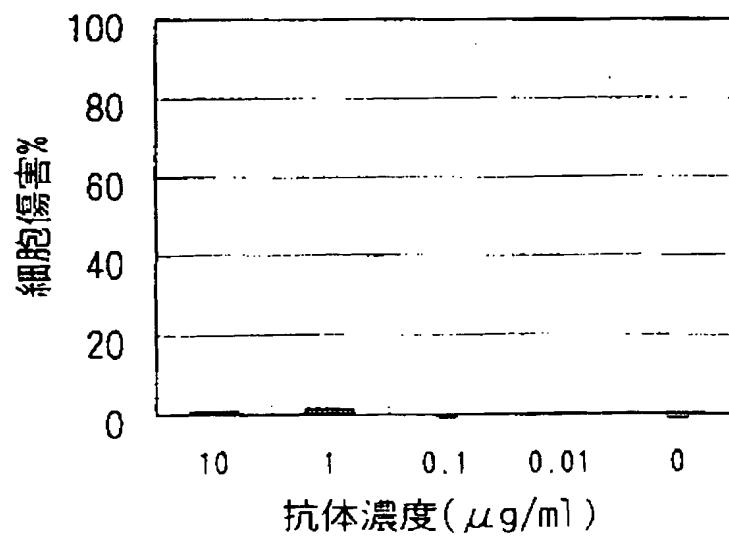


## 第8図

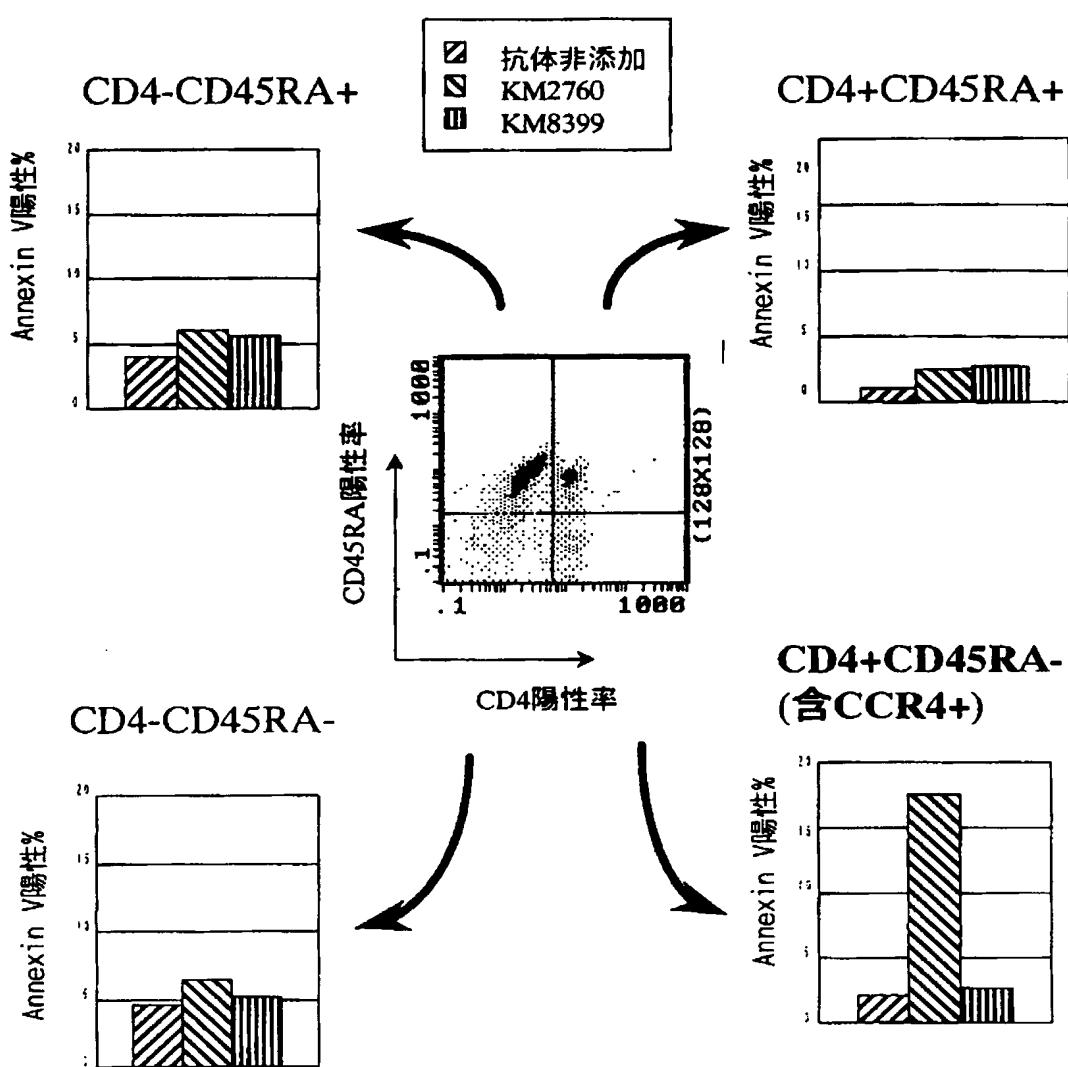
## CCR4/EL-4細胞



## EL-4細胞

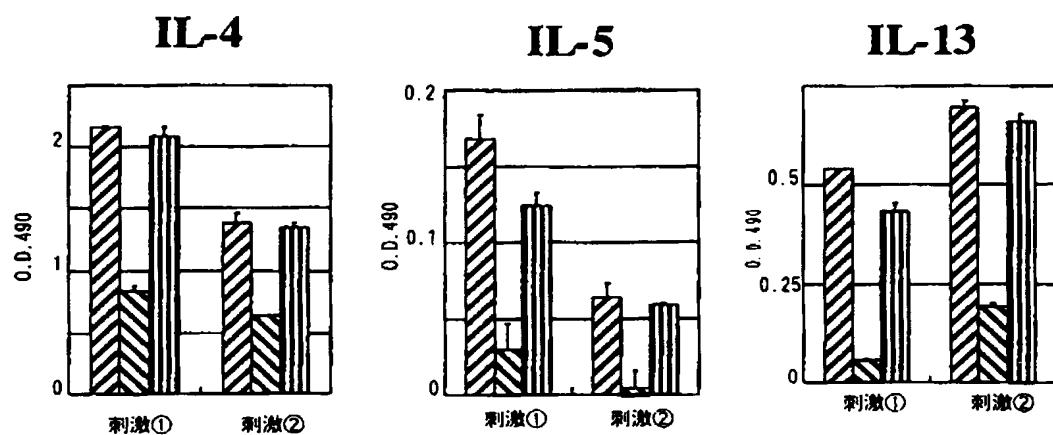


## 第9図

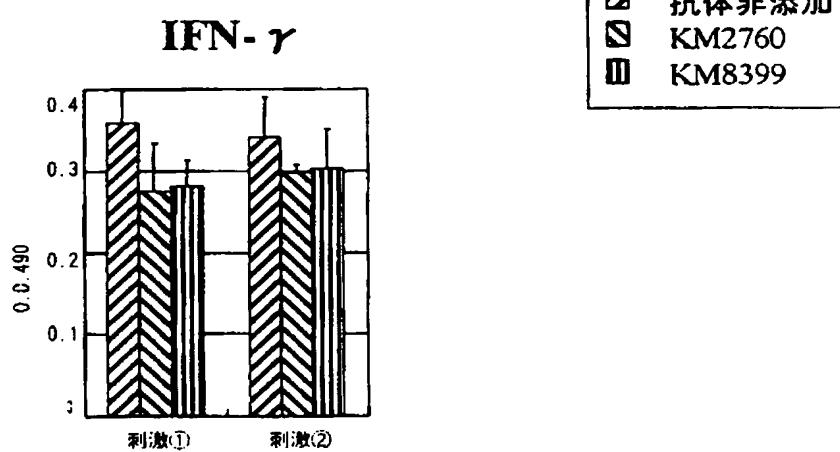


## 第 10 図

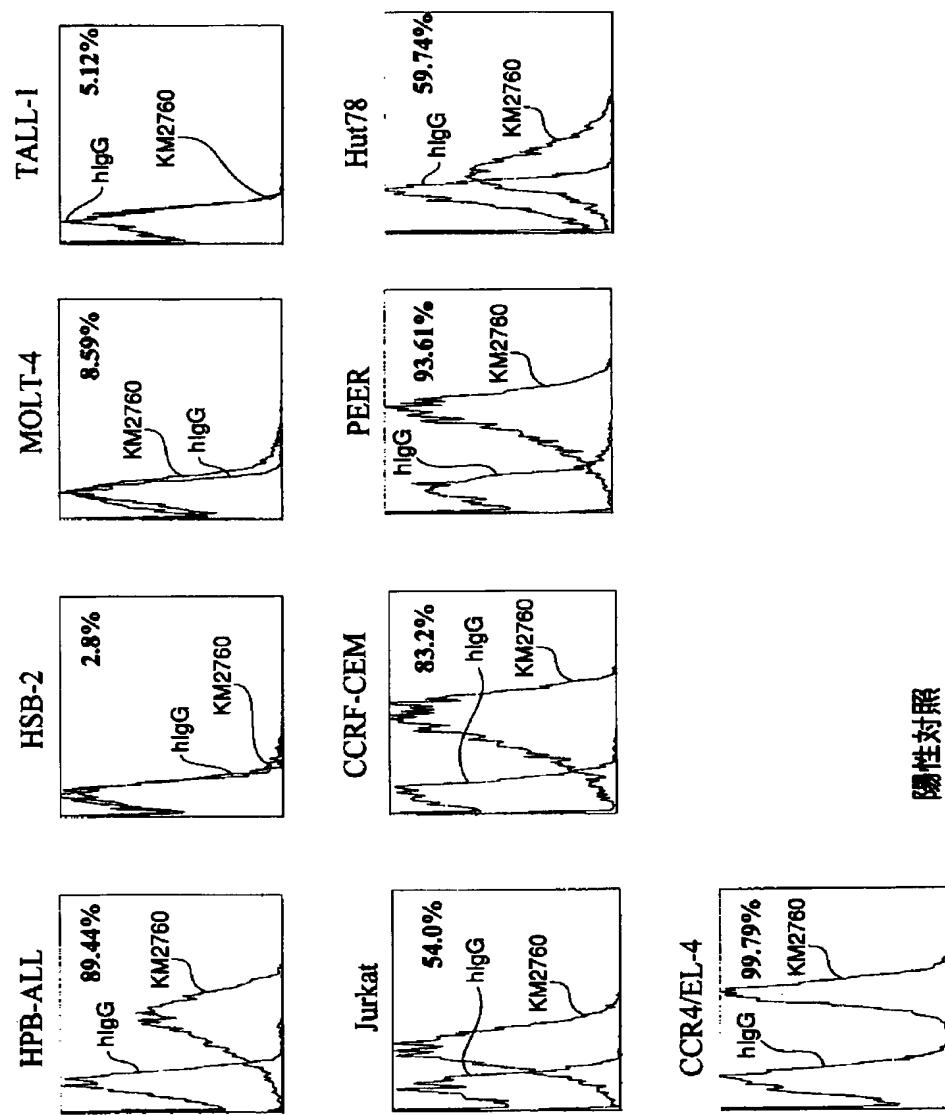
## Th2サイトカイン



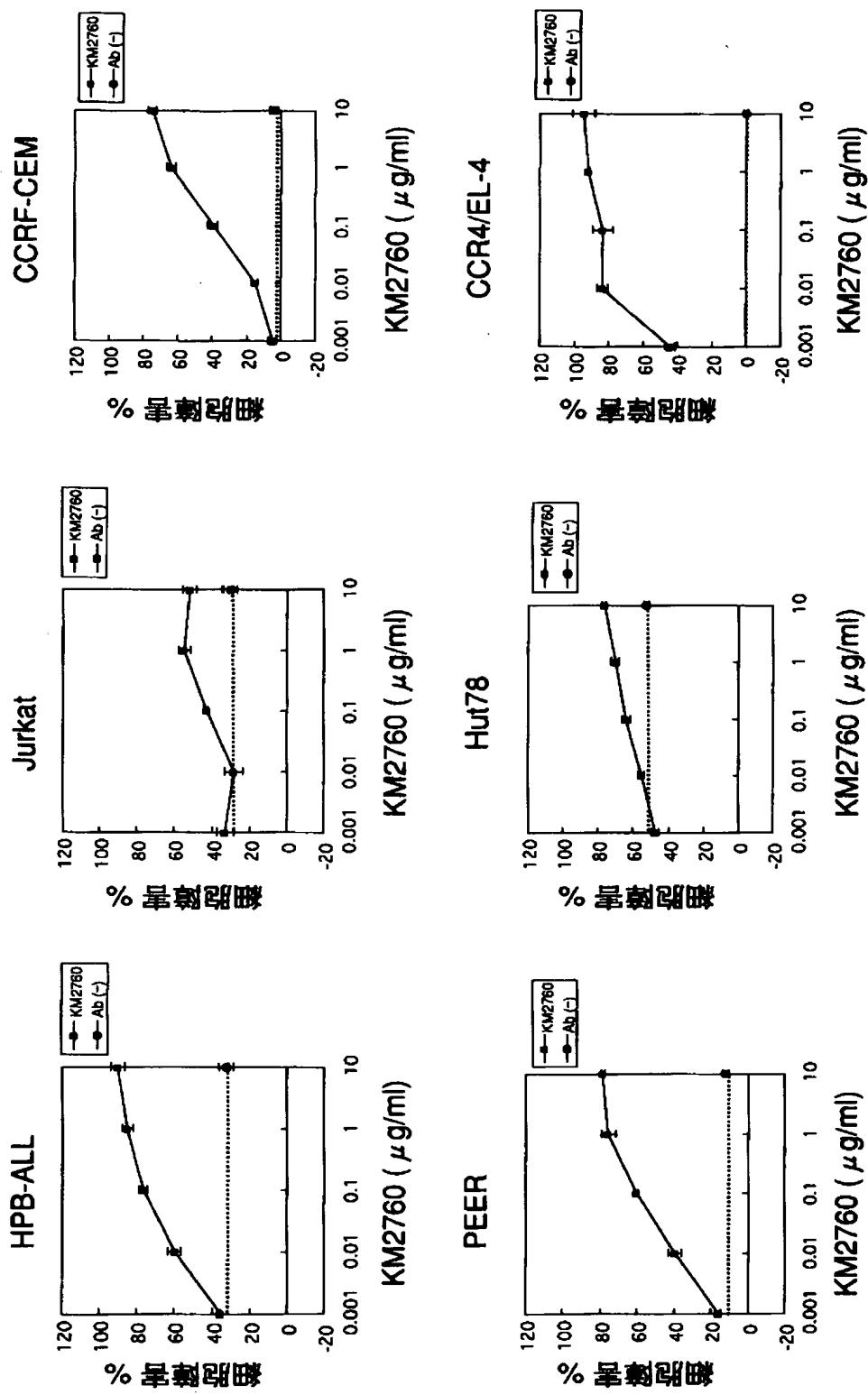
## Th1サイトカイン



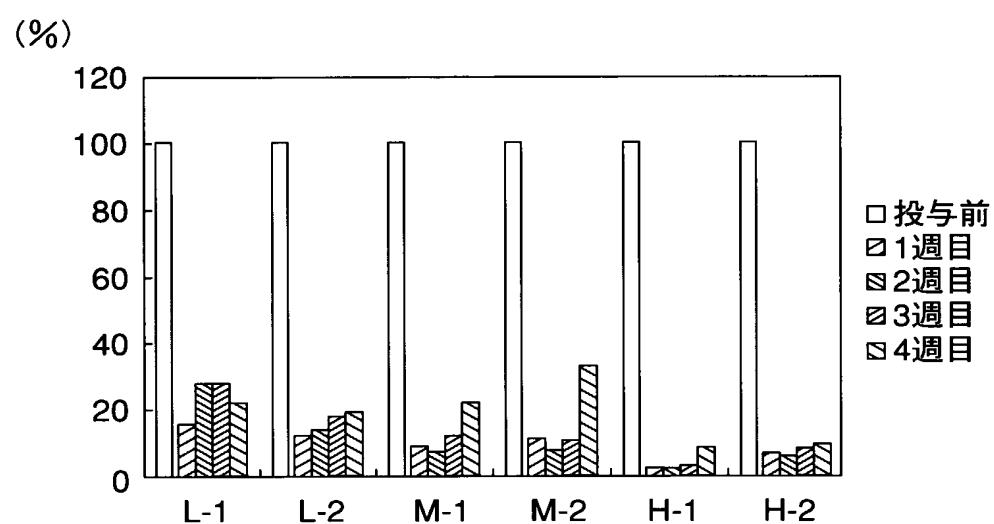
第 11 図



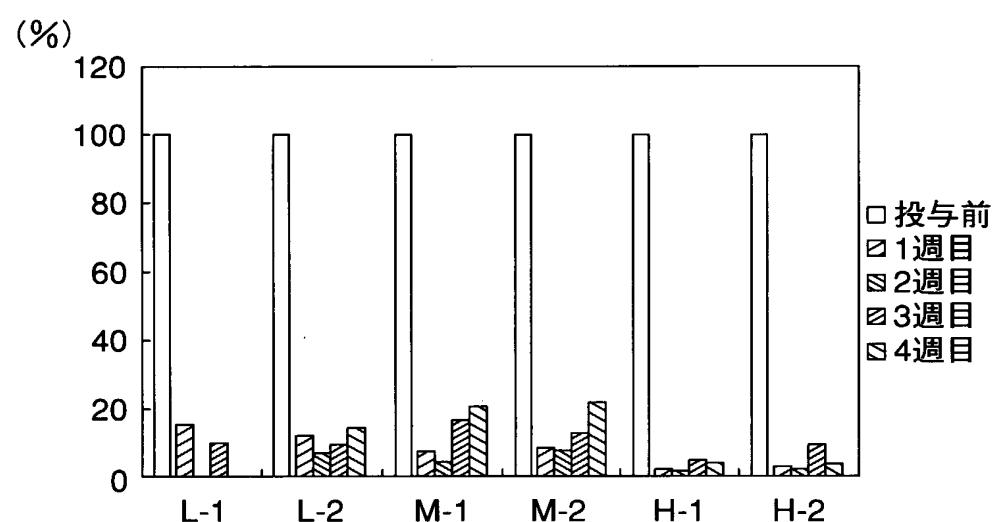
## 第 12 図



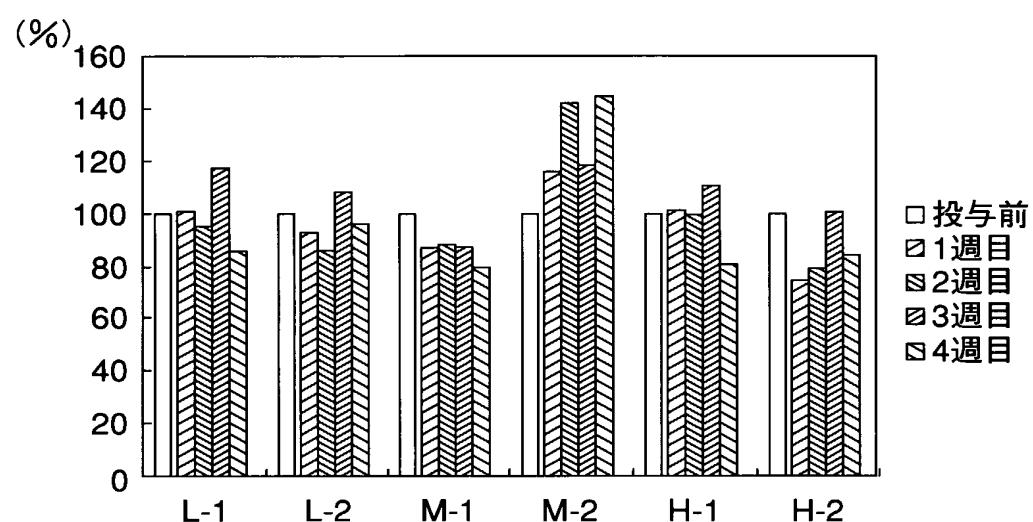
## 第 13 図



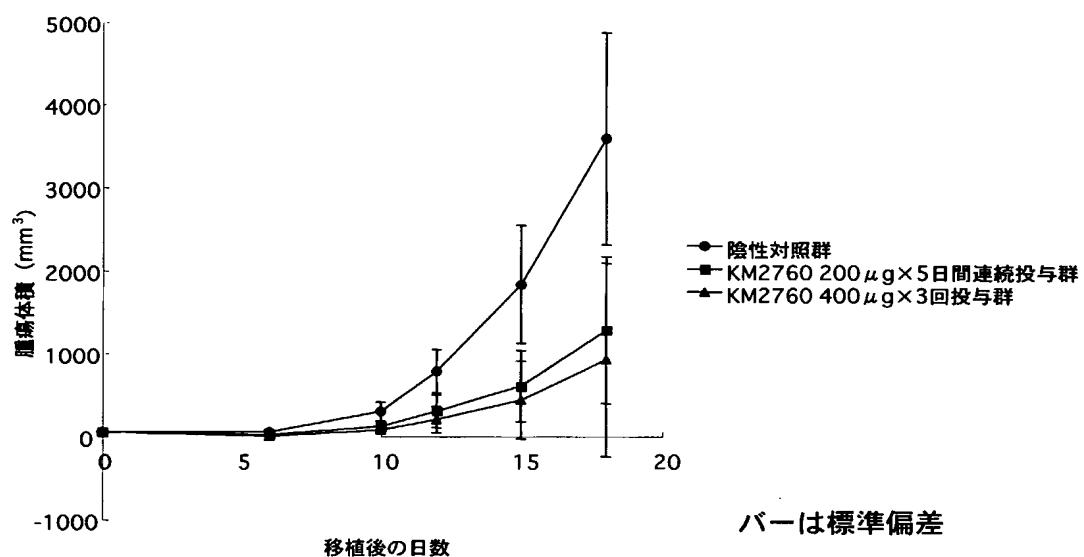
## 第 14 図



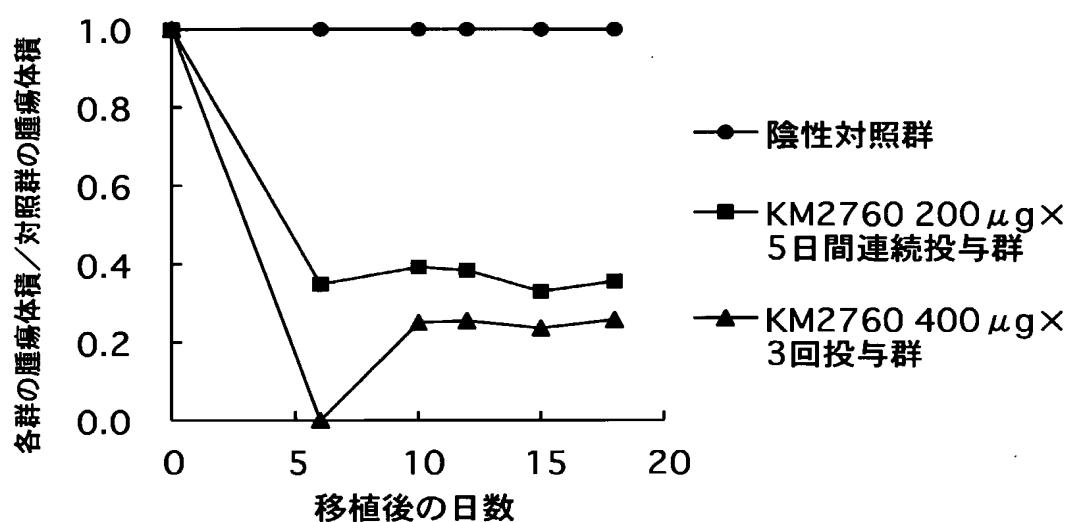
## 第 15 図



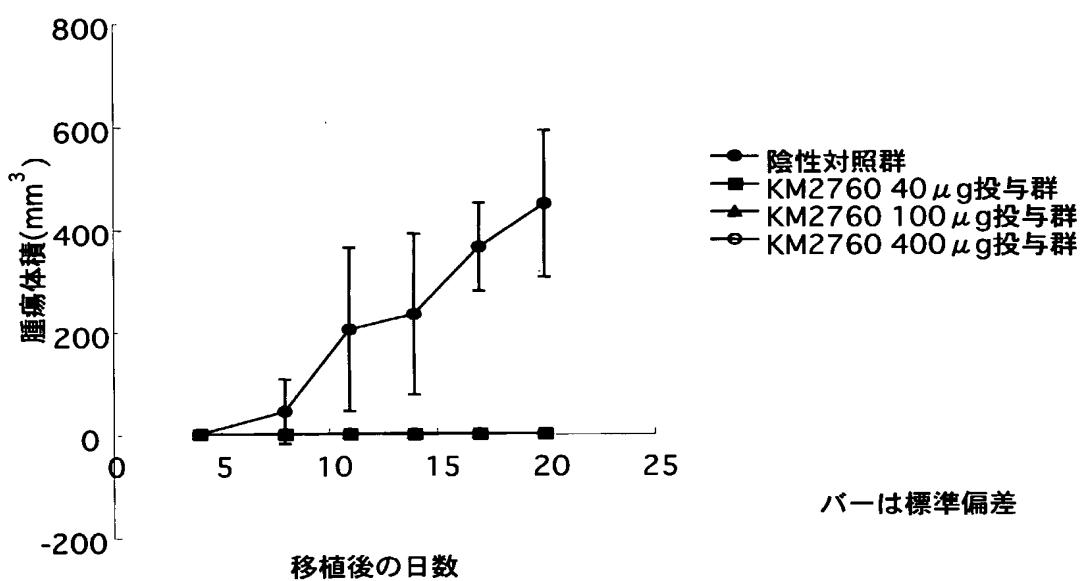
## 第 16 図



第 17 図



## 第 18 図



## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Gene recombinant antibody and antibody fragment thereof

<130> P-36976

<150> JP 2000-59508

<151> 2000-03-03

<150> JP 2000-401563

<151> 2000-12-28

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser  
1 5 10 15

Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys  
20 25

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Asn Ala Thr Glu Val Thr Asp Thr Thr Gln Asp Glu Thr Val Tyr Asn

1	5	10	15
Ser Tyr Tyr Phe Tyr Glu Ser Met Pro Lys Pro Cys			
	20	25	
<210> 3			
<211> 414			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)..(414)			
<400> 3			
atg aac ctc ggg ctc agt ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48			
Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly			
1	5	10	15
gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta atg aag 96			
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys			
20	25	30	
cct gga ggg tcc ctg aaa atc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc 144			
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe			
35	40	45	
agt aat tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac atg agg ctg 192			
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu			
50	55	60	
gaa tgg gtc gca acc att agt agt gct act tat tcc tat tat cca 240			
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro			
65	70	75	80
gac agt gtg aag gga cga ttc acc ata tcc agg gac aac gcc gag aac 288			
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn			
85	90	95	
tcc cta tat ctg caa atg aat agt ctg agg tct gag gac aca ggc ata 336			

Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Gly	Ile	
					100			105							110	
tat	tac	tgt	gga	aga	cat	agc	gat	gga	aac	ttc	gcg	ttt	ggt	tat	tgg	384
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Arg	His	Ser	Asp	Gly	Asn	Phe	Ala	Phe	Gly	Tyr	Trp	
					115			120						125		
ggc	cga	ggg	act	ctg	gtc	act	gtc	tct	gca						414	
Gly	Arg	Gly	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala						
					130			135								
<210> 4																
<211> 396																
<212> DNA																
<213> <i>Mus musculus</i>																
<220>																
<221> CDS																
<222> (1)..(396)																
<400> 4																
atg	aag	ttg	cct	gtt	agg	ctg	ttg	gtg	ctg	atg	ttc	tgg	att	cct	gct	48
Met	Lys	Leu	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Phe	Trp	Ile	Pro	Ala	
1		5							10					15		
tcc	agc	agt	gat	gtt	ttg	atg	acc	caa	act	cca	ctc	tcc	ctg	cct	gtc	96
Ser	Ser	Ser	Asp	Val	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	
					20			25					30			
agt	ctt	gga	gat	caa	gcc	tcc	atc	tct	tgc	aga	tct	agt	cgg	aac	att	144
Ser	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Arg	Asn	Ile	
					35			40				45				
gtt	cat	att	aat	ggt	gac	aca	tat	tta	gaa	tgg	tac	ctg	cag	aga	ccg	192
Val	His	Ile	Asn	Gly	Asp	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Arg	Pro	
					50			55			60					
ggc	cag	tct	cca	aag	ctc	cta	atc	tac	aaa	gtt	tcc	aac	cga	ttt	tct	240
Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	
					65			70			75			80		

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85

90

95

ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc 336  
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys  
 100 105 110

ttt caa ggt tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc agg ctg 384  
 Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Arg Leu  
 115 120 125

gaa atc aga cgg 396  
 Glu Ile Arg Arg  
 130

<210> 5  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> **Mus musculus**

<400> 5  
 Asn Tyr Gly Met Ser  
 1 5

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> **Mus musculus**

<400> 6  
 Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 7  
 <211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 7

His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr  
1 5 10

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 8

Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 9

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 10

Phe Gln Gly Ser Leu Leu Phe Trp Thr  
1 5

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 11

aaggaaaaaa gcggccgcga cccctcacca tgaacctcg

39

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 12

cgatggccc ttggggagg ctgcagagac agtgaccag

39

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 13

ccggaattcg cctcctcaaa atgaagttgc c

31

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 14

agccaccgta cgtctgattt ccagcctgg g

31

<210> 15

<211> 138

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 15

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly  
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys  
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe  
35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro  
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn  
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp  
115 120 125

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
130 135

<210> 16

<211> 132

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 16

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val  
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile  
35 40 45

Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro  
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys  
100 105 110

Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Arg Leu  
115 120 125

Glu Ile Arg Arg

130

<210> 17

<211> 360

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr  
1 5 10 15

Ser	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ser	Ile	Pro	Lys	Pro	Cys	Thr	Lys	Glu
20								25						30	
Gly	Ile	Lys	Ala	Phe	Gly	Glu	Leu	Phe	Leu	Pro	Pro	Leu	Tyr	Ser	Leu
35								40					45		
Val	Phe	Val	Phe	Gly	Leu	Leu	Gly	Asn	Ser	Val	Val	Val	Leu	Val	Leu
50								55					60		
Phe	Lys	Tyr	Lys	Arg	Leu	Arg	Ser	Met	Thr	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Asn
65								70					75		80
Leu	Ala	Ile	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Pro	Phe	Trp	Gly
85										90				95	
Tyr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Gln	Trp	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Leu	Cys	Lys	Met
100								105					110		
Ile	Ser	Trp	Met	Tyr	Leu	Val	Gly	Phe	Tyr	Ser	Gly	Ile	Phe	Phe	Val
115								120					125		
Met	Leu	Met	Ser	Ile	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ile	Val	His	Ala	Val	Phe
130								135					140		
Ser	Leu	Arg	Ala	Arg	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Ile	Thr	Ser	Leu	Ala
145								150					155		160
Thr	Trp	Ser	Val	Ala	Val	Phe	Ala	Ser	Leu	Pro	Gly	Phe	Leu	Phe	Ser
165									170					175	
Thr	Cys	Tyr	Thr	Glu	Arg	Asn	His	Thr	Tyr	Cys	Lys	Thr	Lys	Tyr	Ser
180								185					190		
Leu	Asn	Ser	Thr	Thr	Trp	Lys	Val	Leu	Ser	Ser	Leu	Glu	Ile	Asn	Ile
195								200					205		
Leu	Gly	Leu	Val	Ile	Pro	Leu	Gly	Ile	Met	Leu	Phe	Cys	Tyr	Ser	Met
210								215					220		

Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala  
225 230 235 240

Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr  
245 250 255

Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val  
260 265 270

Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala  
275 280 285

Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr  
290 295 300

Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys  
305 310 315 320

Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln  
325 330 335

Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met  
340 345 350

Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu  
355 360

出願人又は代理人の書類記号 P - 3 6 9 7 6	国際出願番号 PCT/JP01/01656
--------------------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示  
[PCT規則13の2]

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

55 頁、 14-17 行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている

寄託機関の名称

経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

寄託の日付

平成12年2月24日

受託番号

F E R M B P - 7 0 5 4

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）

この情報は別紙に続いている

ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、  
微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、  
試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

E P

E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄

この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員

塚本 佳雅

国際事務局記入欄

この用紙が国際事務局に受理された日

16 MARCH 2001 (16.03.01)

権限のある職員

五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 P - 3 6 9 7 6	国際出願番号 PCT/JP01/01656
--------------------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示  
[PCT規則13の2]

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

55 頁、 14-17 行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている

寄託機関の名称  
経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

寄託の日付  
平成12年2月24日

受託番号  
F E R M B P - 7 0 5 4

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）

この情報は別紙に続いている

オーストラリア特許法施行規則3.25の規定に基づき、  
本願に申し、ブダペスト条約に従って寄託された物質の試料は、  
本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、  
本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に  
要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

A U

E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄

この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員

塚本 佳雅

国際事務局記入欄

この用紙が国際事務局に受理された日

16 MARCH 2001 (16.03.01)

権限のある職員

五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 P-36976	国際出願番号 PCT/JP01/01656
--------------------------	--------------------------

寄託された微生物に関する表示  
[PCT規則13の2]

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

55 頁、 14-17 行

B. 寄託の表示  他の寄託が別紙に記載されている

寄託機関の名称  
経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

寄託の日付  
平成12年2月24日 受託番号  
F E R M B P - 7 0 5 4

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）  この情報は別紙に続いている

カナダ特許法サブセクション104(4)及び  
同特許法規則160(4)の規定に基づき、  
微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、  
試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

CA

E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄

この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員  
塙本佳雅

様式PCT/RO/134 (1992年7月)

国際事務局記入欄

この用紙が国際事務局に受理された日  
16 MARCH 2001 (16.03.01)

権限のある職員  
五十嵐伸司

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01656

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 16/46, 16/28, C12N 15/13, 5/10, C12P 21/08, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/577, A61K 39/395, A61P 11/06, 17/00, 27/14, 37/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K 16/46, 16/28, C12N 15/13, 5/10, C12P 21/08, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/577, A61K 39/395, A61P 11/06, 17/00, 27/14, 37/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
 JICST FILE (JOIS)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X P, Y	WO, 00/67791, A1 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.), 16 November, 2000 (16.11.00) & EP, 1050307, A1 & AU, 200045617, A	1-41, 44-46 47
P, X P, Y	WO, 00/42074, A1 (MILLENIUM PHARMACEUTICALS, INC.), 20 July, 2000 (20.07.00) & AU, 200027266, A	1-41, 44-46 47
X Y	POWER, C. A. et al., "Molecular Cloning and Functional Expression of a Novel CC Chemokine Receptor cDNA from a Human Basophilic Cell Line.", J. Biol. Chem. (1995) Vol.270, No.33, pp.19495-19500	1-41, 44-46 47
Y A	JONES, D. et al., "Expression Pattern of T-Cell-Associated Chemokine Receptors and their Chemokines Correlates with Specific Subtypes of T-cell non-Hodgkin Lymphoma.", Blood (July 2000) Vol.96, No.2, pp.685-690	47 1-41, 44-46

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
31 May, 2001 (31.05.01)

Date of mailing of the international search report  
12 June, 2001 (12.06.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01656

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MUELLER, B. M. et al., "Enhancement of Antibody-Dependent Cytotoxicity with a Chimeric Anti-GD2 Antibody.", J. Immunol. (1990) Vol.144, No.4, pp.1382-1386	1-41,44-46
A	RIECHMANN, L. et al., "Reshaping Human Antibodies for Therapy.", Nature (1988) Vol.332, pp.323-327	1-41,44-46
A	van den BERG, A. et al., "High Expression of the CC Chemokine TARC in Reed-Sternberg Cells. A Possible Explanation for the Characteristic T-Cell Infiltrate in Hodgkin's Lymphoma.", Am. J. Pathol. (1999) Vol.154, No.6, pp.1685-1691	1-41,44-46
A	D'AMBROSIO, D. et al., "Cutting Edge: Selective Up-Regulation of Chemokine Receptors CCR4 and CCR8 upon Activation of Polarized Human Type 2 Th Cells.", J. Immunol. (1998) Vol.161, pp.5111-5115	1-41,44-46
A	BONECCHI, R. et al., "Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s.", J. Exp. Med (1998) Vol.187, No.1, pp.129-134	1-41,44-46
A	WO, 97/10354, A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 20 March, 1997 (20.03.97) & EP, 811691, A1 & US, 6018032, A & AU, 9669438, A	1-41,44-46
A	YOUN, B. -S. et al., "Molecular Cloning and Characterization of a cDNA, CHEMR1, Encoding a Chemokine Receptor With a Homology to the Human C-C Chemokine Receptor, CCR-4.", Blood (1997) Vol.89, No.12, pp.4448-4460	1-41,44-46
A	FRADE, J. M. R. et al., "The Amino-terminal Domain of the CCR2 Chemokine Receptor Acts as Coreceptor for HIV-1 Infection.", J. Clin. Invest. (1997) Vol.100, No.3, pp.497-502	1-41,44-46
A	WO, 00/00219, A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) 06 January, 2000 (06.01.00) & EP, 1090643, A1 & AU, 9942899, A	1-41,44-46
A	WO, 99/25380, A2 (UNIV.KENTUCKY RES.FOUND.), 27 May, 1999 (27.05.99) & EP, 1035864, A2 & AU, 9915903, A	1-41,44-46

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP01/01656

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 42-43  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  

These claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K 16/46, 16/28, C12N 15/13, 5/10, C12P 21/08, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/577,  
A61K 39/395, A61P 11/06, 17/00, 27/14, 37/08

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K 16/46, 16/28, C12N 15/13, 5/10, C12P 21/08, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/577,  
A61K 39/395, A61P 11/06, 17/00, 27/14, 37/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), REGISTRY(STN), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICSTファイル(JOIS)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, Y	WO, 00/67791, A1(APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N. V.) 16. 11月. 2000(16. 11. 00) & EP, 1050307, A1 & AU, 200045617, A	1-41, 44-46 47
P, X P, Y	WO, 00/42074, A1(MILLENIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 20. 7月. 2000(20. 07. 00) & AU, 200027266, A	1-41, 44-46 47

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 31. 05. 01	国際調査報告の発送日 12.06.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X Y	POWER, C. A. et al. "Molecular Cloning and Functional Expression of a Novel CC Chemokine Receptor cDNA from a Human Basophilic Cell Line.", J. Biol. Chem. (1995) Vol. 270, No. 33, p. 19495-19500	<u>1-41, 44-46</u> 47
Y A	JONES, D. et al. "Expression Pattern of T-Cell-Associated Chemokine Receptors and their Chemokines Correlates with Specific Subtypes of T-cell non-Hodgkin Lymphoma.", Blood (2000, Jul.) Vol. 96, No. 2, p. 685-690	<u>47</u> 1-41, 44-46
A	MUELLER, B. M. et al. "Enhancement of Antibody-Dependent Cytotoxicity with a Chimeric Anti-GD2 Antibody.", J. Immunol. (1990) Vol. 144, No. 4, p. 1382-1386	1-41, 44-46
A	RIECHMANN, L. et al. "Reshaping Human Antibodies for Therapy.", Nature (1988) Vol. 332, p. 323-327	1-41, 44-46
A	van den BERG, A. et al. "High Expression of the CC Chemokine TARC in Reed-Sternberg Cells. A Possible Explanation for the Characteristic T-Cell Infiltrate in Hodgkin's Lymphoma.", Am. J. Pathol. (1999) Vol. 154, No. 6, p. 1685-1691	1-41, 44-46
A	D'AMBROSIO, D. et al. "Cutting Edge: Selective Up-Regulation of Chemokine Receptors CCR4 and CCR8 upon Activation of Polarized Human Type 2 Th Cells.", J. Immunol. (1998) Vol. 161, p. 5111-5115	1-41, 44-46
A	BONECCHI, R. et al. "Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s.", J. Exp. Med. (1998) Vol. 187, No. 1, p. 129-134	1-41, 44-46
A	WO, 97/10354, A1 (協和醸酵工業株式会社) 20.3月.1997(20.03.97) & EP, 811691, A1 & US, 6018032, A & AU, 9669438, A	1-41, 44-46
A	YOUN, B. -S. et al. "Molecular Cloning and Characterization of a cDNA, CHEMR1, Encoding a Chemokine Receptor With a Homology to the Human C-C Chemokine Receptor, CCR-4.", Blood (1997) Vol. 89, No. 12, p. 4448-4460	1-41, 44-46
A	FRADE, J. M. R. et al. "The Amino-terminal Domain of the CCR2 Chemokine Receptor Acts as Coreceptor for HIV-1 Infection.", J. Clin. Invest. (1997) Vol. 100, No. 3, p. 497-502	1-41, 44-46

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	WO, 00/00219, A1(中外製薬株式会社) 6. 1月. 2000(06. 01. 00) & EP, 1090643, A1 & AU, 9942899, A	1-41, 44-46
A	WO, 99/25380, A2(UNIV. KENTUCKY RES. FOUND.) 27. 5月. 1999(27. 05. 99) & EP, 1035864, A2 & AU, 9915903, A	1-41, 44-46

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 42-43 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
人の治療方法に関するものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。